

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ТИТОВИЧ ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

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

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат фармацевтических наук,
доцент кафедры фармакологии и
клинической фармакологии
ФГБОУ ВО СПХФУ
Болотова Вера Цезаревна

Санкт-Петербург – 2018 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Механизмы повреждения нейронов на фоне гипоксически-ишемических нарушений.....	13
1.2 Фармакологическая коррекция гипоксически-ишемического повреждения головного мозга.....	27
1.2.1 Производные аминотанола.....	29
1.2.2 Сукцинатсодержащие антигипоксантаы.....	43
1.2.3 Рецепторные механизмы действия сукцината.....	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1 Объекты исследования.....	52
2.2 Экспериментальные животные.....	55
2.3 Методы оценки антигипоксической активности.....	58
2.3.1 Моделирование кратковременной гипоксии.....	58
2.3.2 Модель длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии (ДИНГ).....	64
2.4 Модель перманентной перевязки общих сонных артерий.....	65
2.5 Методы оценки поведения, координации и когнитивных функций животных.....	65
2.5.1 Тест «Открытое поле» (ОП).....	65
2.5.2 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ).....	66
2.5.3 Тест «Ротарод».....	67
2.5.4 Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ).....	68
2.5.5 Тест «Экстраполяционное избавление» (ЭПИ).....	69
2.5.6 Тест «Т-лабиринт».....	69
2.6 Биохимические методы исследования.....	71
2.6.1 Биохимические методы исследования крови.....	71

2.6.2	Биохимические методы исследования ткани мозга.....	71
2.7	Гематологические исследования.....	75
2.8	Статистическая обработка результатов.....	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....		77
3.1	Влияние ФДЭС на переносимость мышами острой гипоксии.....	77
3.2	Фармакологическая активность ФДЭС в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии.....	87
3.2.1	Влияние ФДЭС на поведение животных в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».....	87
3.2.2	Влияние ФДЭС на биохимические показатели в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии.....	101
3.2.3	Влияние ФДЭС на показатели гемограммы.....	108
3.3	Изучение нейропротекторной активности ФДЭС в условиях экспериментальной ишемии головного мозга.....	110
3.3.1	Влияние ФДЭС на выживаемость животных после перманентной перевязки общих сонных артерий.....	110
3.3.2	Влияние ФДЭС на координацию движений при ишемии головного мозга.....	112
3.3.3	Изучение влияния ФДЭС на поведение животных в «Открытое поле» после перманентной перевязки общих сонных артерий.....	114
3.4	Влияние ФДЭС на когнитивные функции.....	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		126
ВЫВОДЫ.....		130
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....		131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Гипоксия и ишемия головного мозга возникают при таких патологических состояниях, как острые и хронические нарушения мозгового кровообращения, черепно-мозговая травма, 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.

В клинической практике с этой целью традиционно применяются лекарственные средства, обладающие антигипоксическим, антиоксидантным, нейропротекторным и нейрореабилитационным действием. Совокупность подобных видов активности позволяет отнести такие фармакологические средства к классу ноотропов, для которых поддержка процессов памяти, внимания и мышления, в сочетании с нейропротекторным действием, являются основными классификационными свойствами [Шустов Е.Б. и др., 2015].

В настоящее время к классу ноотропных препаратов относятся производные пирролидона, препараты нейроаминокислот, производные витаминов, янтарной кислоты, препараты, содержащие нейропептиды и их аналоги, предшественники фосфолипидов, непрямые холиномиметики. Определенные перспективы в развитии ноотропных препаратов связывают с установлением роли аминоктанолов как функциональных и структурных компонентов нейрональных мембран, а также агонистов рецепторов в ЦНС, в частности, к кислотам цикла

трикарбоновых кислот – бутандиовой (янтарной), фумаровой, альфа-кетоглутаровой. Известно, что в ЦНС бутандиовая кислота реализует свои эффекты как лиганд специфических рецепторов (SUCNR1, SUCNR1), расположенных на цитоплазматической мембране нейронов коры и астроцитов, и сопряженных с G-белками (G_i/G_o и G_q). Предполагается, что бутандиовая кислота выполняет роль центрального триггера, регулирующего высвобождение проангиогенных факторов после гипоксии/ишемии мозга, позволяющего ограничивать размер инфаркта [Лукьянова Л.Д., 2011; Шустов Е.Б., Оковитый С.В., 2015].

Степень разработанности

Для производных аминоэтанола отмечается широкий спектр фармакологических эффектов. Так, они способны снижать проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для холина [Cornford E.M., 1978], взаимодействовать с холинергическими рецепторами, стимулировать выброс ацетилхолина [Pomeroy A.R., 1972; Kostopoulos G.K., 1975], обладают антиоксидантными свойствами [Karen E., 2002], могут фосфорилироваться и встраиваться в мембранную структуры в форме фосфатидил-диметиламиноэтанола [Miyazaki I., 1976].

На сегодняшний день производные аминоэтанола применяются при заболеваниях ЦНС таких, как ишемический инсульт [Hurtado O., 2005; Diederich K., 2012; Gutierrez-Fernandez M., 2012], при лечении травм головного мозга, хронического алкоголизма, отравлении барбитуратами, а также для повышения умственной работоспособности у пожилых людей и др. [Schmidt H., 1970; Vojtechovsky M., 1969; Herrschaft H., 1974; Nagy I.Z., 2002].

Одним из перспективных путей повышения эффективности производных аминоэтанолов является их комбинирование с дикарбоновыми кислотами. Катионные части таких молекул могут выступать в роли носителей дикарбоновых кислот через гистогематические барьеры и биологические мембраны, проявляя

дополнительное антиоксидантное и антигипоксическое действие [Шустов Е.Б. и др. 2015].

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 нового соединения - производного диэтиламиноэтанола с янтарной и фумаровой кислотами. Можно предположить, что такое соединение будет 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; Illingworth D.R., 1972; Jope R.S., 1979a; Pomeroy A.R., 1972; Kostopoulos G.K., 1975; Karen E., 2002; Malanga G., 2012; Макарова Л.М., 2006], усиливать энергетические возможности нейронов за счет активации окисления сукцината в митохондриях [Лукьянова Л.Д., 1976, 2009; Lukyanova L.D., 2015]. В результате этого можно ожидать повышения концентрации внимания, запоминания и способности к воспроизведению полученной информации, оптимизации познавательных и поведенческих реакций, снижения неврологического дефицита и эмоциональной неустойчивости, регресса неврологической симптоматики при патологических состояниях.

Соответствие исследования государственным и ведомственным программам

Разработка новых, более эффективных средств в рамках восстановительной неврологии рассматривается как одна из приоритетных задач отечественной медицинской науки (Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 №2580-р «Об утверждении стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года», п.2.9. Научная платформа «Неврология и нейронауки», п. 2.7. Научная платформа «Фармакология»).

Работа выполнялась в рамках Государственного контракта №14. N08.12.0120 ДИ «Лекарственное средство на основе солей органических кислот с диэтиламиноэтанолом, обладающего нейропротекторным действием (2016-2018).

Исследование также было поддержано грантом №0011898 Фонда содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере на работу «Изыскание фармакологического средства с нейропротекторной и актопротекторной активностями среди продуктов взаимодействия диэтиламиноэтанола с дикарбоновыми кислотами».

Цель диссертационной работы

Изучить антигипоксическую и ноотропную активность бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоата (ФДЭС) при гипоксически-ишемических повреждениях мозга.

Задачи исследования

1. Изучить антигипоксическую активность бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} 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-диэтилэтанамина} 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-диэтилэтанамина} бутандиоата в условиях экспериментальной ишемии головного мозга;
4. Оценить влияние бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} 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, превосходящее препараты 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 (ДИНГ), 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-диэтилэтанамина} 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-диэтилэтанамина} 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-диэтилэтанамина} 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 курс 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 диэтилэтанамина} бутандиоат способствует сохранению и воспроизведению полученной информации в тестах «Экстраляционное избавление» и «Т-Лабиринт», оказывает антиамнестический эффект в тесте «УРПИ».

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы 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), международная конференция «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 сессией молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (Нижний Новгород, Россия, 2017), XIII научно-практическая конференция «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 методологии и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и использованной литературы, включающего 277 источника, в том числе 76 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-диэтилэтанимина}бутандиоата».

ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Механизмы повреждения нейронов на фоне гипоксически-ишемических нарушений

Гипоксией называется состояние, наступающее в организме при неадекватном снабжении тканей и органов кислородом или при нарушении его утилизации в них в процессе биологического окисления [Чарный А.М. 1961]. В наиболее общем виде гипоксию можно определить, как несоответствие энергопотребности клетки энергопродукции в системе митохондриального окислительного фосфорилирования [Оковитый С.В. и др. 2001].

В основе развития гипоксии лежит снижение доставки и утилизации кислорода в клетках организма, что может быть обусловлено нарушением функционирования дыхательной и сердечно-сосудистой систем, транспорта крови, митохондриальной дисфункцией и т.д., а главным патогенетическим звеном при кислородном голодании тканей любой природы является дефицит энергии в клетках [Александрова А.Е., 2005].

Практически любые нарушения, связанные с возникновением дефицита транспорта и утилизации кислорода клетками мозга (в том числе – при нарушениях мозговой микроциркуляции любого генеза), протекают как гипоксически-ишемические повреждения тканей.

Гипоксически-ишемическое повреждение – это неадекватное поступление кислорода в ткани мозга вследствие сочетания гипоксемии и ишемии. При этом, повреждающее действие гипоксии, усугубляется лавинообразным накоплением недоокисленных продуктов с появлением высокотоксичных свободных радикалов. Продукты перекисного окисления липидов, повреждая мембраны (в том числе – митохондриальные), усугубляют нарушения энергетического обмена, создавая тем самым порочный круг гипоксического повреждения [Александрова А.Е., 2005]. Возникающий дефицит макроэргов (интенсивное

расходование и невозможность синхронизации ресинтеза со скоростью их потребления) запускает каскад накопления недоокисленных продуктов, включая продукты перекисного и свободнорадикального окисления (Рисунок 1). Механизмы, по которым развивается гипоксически-ишемическое повреждение, реализуются в результате сложного каскада патофизиологических процессов, конечным исходом которых может быть гибель нейрона [Салмина А.Б., 2008].

Гипоксически-ишемическое повреждение головного мозга развивается в три этапа:

1. *фаза гипоксии*, в которой наблюдается быстрая метаболическая перестройка обмена в нейронах и глиальных клетках, направленная на адаптацию к недостаточному поступлению кислорода;
2. *фаза ишемии*, в которой наблюдается преобладание сопряженных с гипоксией и ацидозом некротических процессов в ишемизированных областях;
3. *фаза реперфузии*, где преобладают процессы апоптоза, выходящие за ишемические области.

Фаза гипоксии. Митохондрии являются ключевой мишенью для гипоксии. Кислород, как субстрат терминального фермента дыхательной цепи - цитохромоксидазы, принимает участие в реакциях аэробного синтеза. Поэтому дефицит его в окружающей клетку среде может подавлять аэробный синтез и снижать содержание макроэргов (АТФ, КФ), а также мембранный потенциал.

В нормоксических условиях процесс окислительного фосфорилирования осуществляется в митохондриях в три этапа.

На *первом* этапе донаторами H^+ являются окисляемые субстраты цикла Кребса и пентозного цикла (сукцинат, пируват, глутамат и др.). В качестве акцепторов H^+ выступают НАД-зависимые дегидрогеназы.

На *втором этапе* тканевого дыхания передача H^+ от НАДН осуществляется на флавопротеины, сукцинатдегидрогеназу, а затем на коэнзим Q_{10} и цитохром b.

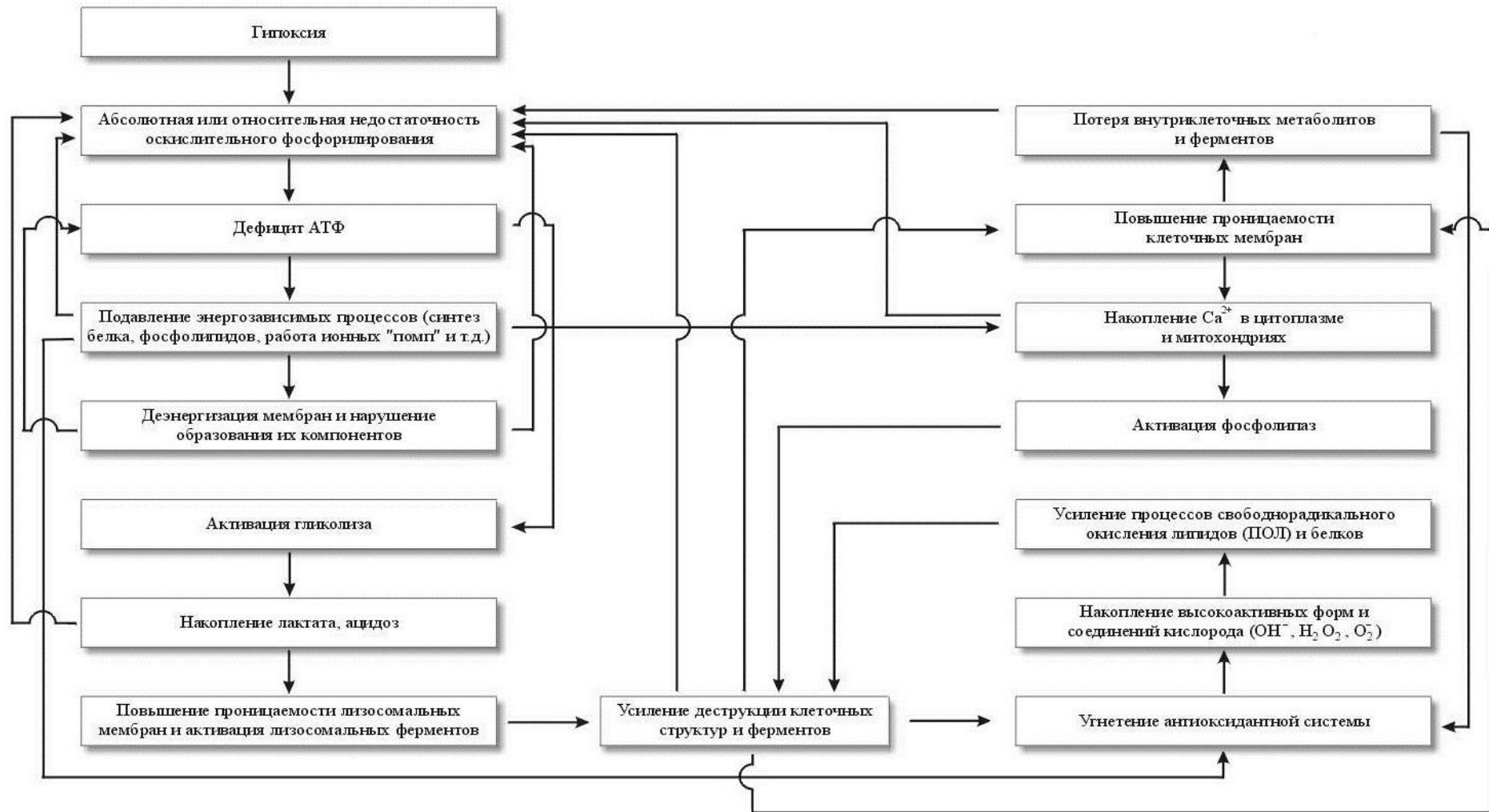


Рисунок 1 – Некоторые звенья патогенеза гипоксических состояний [Оковитый С.В., 2004]

Важно подчеркнуть, что система ферментов второго этапа может принимать H^+ и непосредственно от окисляемых субстратов, главным из которых является сукцинат, через флавопротеины 24 [Лукиянова Л.Д., 2004а; 2004б; 2011].

На *третьем этапе* процесса окислительного фосфорилирования H^+ поступает в систему цитохромов С и далее на кислород. В результате этих реакций образуются вода и углекислый газ [Лукиянова Л.Д., 2007; Lukyanova L.D., 2015].

В гипоксических условиях происходит перепрограммирование работы дыхательной цепи: обратимое подавление электронно-транспортной функции НАДН/убихинон-оксидоредуктазы (МФК I) и компенсаторная активация сукцинатдегидрогеназы (МФК II). При этом резко возрастают содержание сукцината в крови и тканях, а также вклад сукцинатоксидазного окисления в общее дыхание [Лукиянова Л.Д., 2011, 2012; Lukyanova L.D., et al. 2015].

В условиях гипоксии сукцинатоксидазный путь окисления имеет термодинамические преимущества перед окислением НАД-зависимых субстратов цикла трикарбоновых кислот, и, несмотря на то, что при этом сохраняются только два пункта фосфорилирования, высокие скорости реакции обеспечивают энергетическую эффективность процесса в целом. Поэтому при гипоксии идет усиленное образование сукцината так называемыми короткими путями: из аспартата, глутамата, γ -аминомасляной кислоты и аланина [Ariza A.C. et al., 2012; Hohl C. et al., 1987; Komaromy-Hiller G. et al., 1997; Sadagopan N. et al., 2007; Taegtmeyer H., 1978; Wiesner R. . et al., 1988; Кирова Ю.И., 2016].

Переключение при гипоксии метаболических путей от окисления НАД-зависимых субстратов на окисление сукцината обусловлено следующими причинами [Кондрашова М.Н., 1989; Лукиянова Л.Д., 1987, 1997, 2001; Маевский Е.И. и др., 2001; Кирова Ю.И., 2016]:

1) чувствительностью МФК II к редокс состоянию пиридиннуклеотидов, железосерного кластера МФК I и коэнзима Q, ее

способностью активироваться при росте степени их восстановленности при гипоксии и тормозиться при их окислении;

2) ограничением щавелевоуксусного торможения, подавляющего сукцинатзависимое дыхание, так как в условиях высокой восстановленности дыхательной цепи оксалоацетат – конкурентный ингибитор СДГ – восстанавливается в малат и его ингибирующее действие на фермент уменьшается;

3) кинетическими преимуществами окисления сукцината - ФАД-зависимого субстрата - в условиях высокой восстановленности НАДН (гипоксия) перед НАД-зависимыми субстратами благодаря тому, что флавины в этих условиях сохраняются в более окисленном состоянии;

4) способностью сукцинатзависимого окисления поддерживать высокую скорость доставки восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь и обеспечивать наибольший выход богатых энергией соединений в единицу времени.

При сохранении повреждающего фактора острой гипоксии или длительного гипоксического воздействия происходит нарушение электронтранспортной функции дыхательной цепи в области убихинон/цитохром с-редуктазы (МФК III), а затем и цитохрооксидазы (МФК IV), приводящее к общей дезэнергизации [Лукьянова Л.Д., 2011].

Помимо субстратных механизмов регуляции энергопродукции в клетке при гипоксии важная роль принадлежит генно-опосредованным механизмам адаптации. Согласно современным представлениям, ведущая роль в формировании таких механизмов адаптации к гипоксии принадлежит специфическому белковому фактору, индуцируемому при гипоксии – HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor), который выполняет функцию транскрипционного активатора и ключевого регулятора самых различных клеточных и системных ответов на гипоксию [Semenza G.L, 1992, 1998, 2002, 2003, 2004, 2009; Maxwell P.H., 1999; Bruick R.K., 2001].

HIF-1 является гетеродимерным белком, экспрессия одной из субъединиц которого – HIF-1 α регулируется кислородом, в то время как субъединица HIF-1 β экспрессируется постоянно. При нормальной концентрации кислорода в клетке происходит гидроксирование аминокислотных остатков пролина молекулы HIF-1 α в результате активности O₂ и/или Fe²⁺-зависимого фермента пролилгидроксилазы (PHD), который является молекулярным сенсором кислорода. Измененная таким образом субъединица HIF-1 α через ряд стадий подвергается протеасомной деградации [Портниченко В.И., 2012; Myllyharju J., 2013].

В состоянии гипоксии белковая молекула HIF-1 α не гидроксирована, а оставаясь стабильной, накапливается, после чего субъединицы HIF-1 α и HIF-1 β объединяются. Образовавшийся в результате этого транскрипционный белок HIF-1 в ядре клетки связывается с особыми последовательностями ДНК в генах, экспрессия которых индуцируется гипоксией [Semenza G.L., 2009].

Увеличение уровня HIF-1 α приводит к повышению экспрессии генов, которые обеспечивают адаптацию клетки к гипоксии и стимулируют эритропоэз (гены эритропоэтина), ангиогенез (ген фактора роста эндотелия сосудов (VEGF)), ферменты гликолиза (ген альдолазы, лактатдегидрогеназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы и пр.). Кроме того, HIF-1 регулирует экспрессию генов, участвующих в обмене железа, регуляции сосудистого тонуса, клеточной пролиферации, апоптозе, липогенезе, формировании каротидных клубочков, развитии В-лимфоцитов и др. [Павлов А.Д., 2011; Qingdong K. 2006; Sandoel A., 2010; Zagorska A., 2004].

Кроме того, синтез HIF-1 α может регулироваться через кислород-независимые механизмы. Так, образование HIF-1 α может регулироваться такими сигнальными системами, как MAPK (mitogen activated protein kinase - активируется пролиферативными сигналами) и PI3K (фосфатидилинозитол-3 киназа - регуляторный белок, находящийся на пересечении различных сигнальных путей и контролирующей ключевые

функции клетки, в том числе рост, выживаемость, старение, опухолевую трансформацию). Следует отметить, что PI3K относится к группе ферментов, объединенных под названием «киназы, защищающие от реперфузионных повреждений» (RISK). Эти киназы, как полагают, могут выступать в качестве мишеней для фармакологического воздействия при реперфузионных повреждениях, которые наряду с ишемическими повреждениями играют важное прогностическое значение. Активация этой группы ферментов приводит к ингибированию открытия митохондриальных пор, в результате чего и реализуется цитопротекторное действие [Галагудза М.М., 2007]. Активируются сигнальные системы MAPK и PI3K через рецептор тирозинкиназы, специфический сукцинатный рецептор SUCNR1 и др. Агонистами рецепторов выступают тирозингидроксилаза, цитокины, факторы роста (например, инсулиноподобный фактор роста) и сукцинат [Лукьянова Л.Д., 2011].

Фаза ишемии. Эта фаза характеризуется нарушением внутриклеточной концентрации ионов, которое инициируется избыточным выбросом возбуждающих нейротрансмиттеров (глутамата, аспартата) с последующей активацией глутаматных рецепторов, и развитием эксайтотоксичности [Choi D.W., 1985, 1995, 1992]. Глутамат реализует свои эффекты через группу ионотропных мембранных рецепторов (NMDA-N-метил-D-аспартат, AMPA- α -амино-3гидрокси-5-амино-4-изоксазолпропионовой кислоты рецептор), и метаботропных рецепторов [Schramm M., 1990; Ferraguti F., Shigemoto R., 2006; Семенов Д.Г., 2012].

Считается, что развитие эксайтотоксичности связано со способностью митохондрий депонировать Ca^{2+} [Budd S.L., 1996; Stout A.K. et al., 1998; Vergun O. et al., 2001]. Захват Ca^{2+} митохондриями не снижает накопление Ca^{2+} в других участках тела нейрона в условиях активации NMDA-каналов, что приводит к Ca^{2+} «перегрузке» в первую очередь цитоплазмы, а затем и митохондрий. Высокая концентрация Ca^{2+} является обязательным условием гибели нейронов, вызванной гиперстимуляцией NMDA рецепторов, при

наличии электрогенного транспорта Ca^{2+} в митохондриях [Stout A.K. et al., 1998]. Видимо, именно вызванная кальциевой «перегрузкой» дисфункция митохондрий, требующая функционирования дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, является ключевым моментом инициации гибели нейронов [Khodorov B., 2004].

Избыток глутамата помимо повреждения нейронов, также изменяет экспрессию молекул, определяющих эффективность межклеточных взаимодействий и ответ клеток на ишемическое повреждение. Изменение экспрессии генов, микро-РНК и состояния факторов транскрипции происходят в течение нескольких минут/часов после развития острой церебральной гипоксии - ишемии.

Таким образом, высвобождение глутамата увеличивает ток Ca^{2+} внутрь клетки [Choi D.W., 1987], активирует кальций-зависимые протеазы, включая каспазы, калпаины и фосфолипазы, что в результате приводит повышению образования свободных радикалов, дезорганизации клеточной мембраны и нарушению цитоскелета [Han H.S., 2003; Yenari M.A., 2006].

Важную роль в формировании ишемического повреждения клеток играет транскрипционный фактор NF- κ B. Он находится в цитоплазме в неактивном состоянии и связан с белками-ингибиторами. В ответ на острую ишемию IkB-киназа фосфорилирует белки-ингибиторы, высвобождая тем самым NF- κ B, который в свою очередь, проникая в ядро, вызывает экспрессию генов, кодирующих белки, запускающих апоптоз [Janssen-Heininger Y.M., 2000; Haddad J.J., 2002].

Фаза реперфузии. Она начинается через 2–6 ч после гипоксии-ишемии и обуславливает терапевтическое окно, в течение которого практически все изменения могут носить обратимый характер [Fan X., 2010; Ианг И., 2012; Салмина А.Б., 2008]. В то же время эта фаза ассоциирована не только с восстановлением, но и дополнительным повреждением ткани. Именно на этом этапе происходит увеличение генерации активных форм кислорода, дополнительное неконтролируемое возрастание внутриклеточной

концентрации кальция. Каскад молекулярных реакций представлен далее в порядке их возникновения [Моргун А.В., 2013].

1. Приток кальция и образование свободных радикалов

Избыточная генерация активных форм кислорода (АФК) при реперфузии возникает преимущественно в результате поступления O_2 в клетки в условиях не восстановившейся работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, а также вследствие активации метаболизма арахидоновой кислоты. В сочетании с дефицитом энергии, который развивается в фазу ишемии, эти процессы вызывают избыточный приток Ca^{2+} , что дополнительно увеличивает высвобождение во внеклеточное пространство глутамата. Это способствует образованию свободных радикалов и активации кальций-зависимых липаз, протеаз и эндонуклеаз [Semenov D., 2002].

Повреждающему эффекту свободных радикалов (СР), АФК противостоит система противooksидлительной защиты, главным действующим звеном которой являются антиоксиданты — соединения, способные тормозить, уменьшать интенсивность свободнорадикального окисления (СРО), нейтрализовывать СР путем обмена своего атома водорода (в большинстве случаев) на кислород свободных радикалов [Кулинский В.И., 1999].

К основным ферментам антиоксидантной защиты относятся:

1. Супероксиддисмутаза (СОД) в присутствии меди, цинка, марганца и железа способна расщеплять надперекись в перекись водорода и кислород. Фермент присутствует почти во всех аэробных клетках и внеклеточной жидкости.

СОД имеет несколько изоферментных форм, отличающихся активным центром. Их принято классифицировать по строению активного центра и структурной организации молекул. В организмах млекопитающих выявляются 3 основные изоформы СОД: медь-цинковая (Cu,Zn-СОД, СОД1), марганцевая (Mn-СОД, СОД2), экстрацеллюлярная (Э-СОД, СОД3).

Медь-цинковая форма (Cu,Zn-СОД, СОД1) является главным цитозольным изоферментом, также выявляется в ядрах, пероксисомах, лизосомах и митохондриях. Основная часть содержится в цитоплазме, межмембранном пространстве митохондрий и на поверхности пероксисом.

Известно, что Cu,Zn-СОД ингибируется продуктом реакции – пероксидом водорода и, таким образом, снижение активности этого фермента является маркером дисбаланса H_2O_2 -продуцирующих и H_2O_2 -элиминирующих ферментных систем [Bray R.C., 1974; Choi J. et al., 2005; Hodgson E.K., 1975; Pigeolet E. et al., 1990].

Марганцевая форма (Mn-СОД, СОД2) локализована в митохондриях. Её характерной особенностью является резистентность к H_2O_2 .

При гипоксии наблюдается значимое увеличение активности Mn-СОД, равно как и активация синтеза ее мРНК, а активность Cu,Zn-СОД в астроцитах не изменяется, хотя наблюдается увеличение экспрессии этих генов.

2. Каталаза превращает перекись водорода в воду и кислород при помощи железа и марганца. Она завершает процесс детоксикации, начатый СОД.

Активность каталазы в коре головного мозга изменяется в зависимости от тяжести гипоксии. Так при гипоксии легкой и средней тяжести (14-10,5%) наблюдается повышение активности каталазы, а при тяжелой гипоксии (<8%), активность каталазы угнетается [Кирова Ю.И., 2016; Мамадалиева Н.И., 2014]

3. Глутатионпероксидаза (ГПО) и глутатионредуктаза (ГР) – ферменты, содержащие селен. Они помогают переработать перекись водорода и органические пероксиды в спирты.

Активность ГПО лимитируется двумя факторами – наличием в организме селена [Halliwell B., 1999] и скоростью восстановления GSSG [Tandogan B., 2006]. Известно, что экспрессия ГПО регулируется напряжением кислорода [Merante F. et al., 2002]. Ген фермента содержит два

кислородзависимых участка, которые активируют транскрипцию в ответ на увеличение уровня кислорода. Таким образом, гипоксические условия могут подавлять экспрессию ГПО – главного фермента антиперекисной системы мозга и тем самым провоцировать аккумуляцию пероксида водорода.

2. Накопление свободного железа

В фазу гипоксии из-за изменения рН происходит высвобождение железа, связанного с белками нейронов и микроглии. При реперфузии и реоксигенации свободное железо способствует развитию реакции Фентона, что приводит к образованию дополнительного количества цитотоксических свободных радикалов [Papazisis G., 2008; Моргун А.В. и др., 2013].

3. Синтаза оксида азота

Оксид азота (NO) является соединением, продуцируемым синтазой оксида азота (NOS), которая существует в трех изоформах и экспрессируется в нейронах, астроцитах и эндотелиоцитах. Эндотелиальная форма NOS обладает нейропротекторной функцией, которая реализуется через NO-опосредованное увеличение перфузии головного мозга [Cimino M., 2005]. Фермент начинает активно синтезировать NO в ответ на повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . При реперфузии и реоксигенации после гипоксии-ишемии NOS активируется избыточно, что ведет к избыточной продукции NO. При этом постоянная выработка NO производится эндотелиальной формой фермента, которая активируется проникающими через ГЭБ нейтрофилами, макрофагами, а также микроглией. Взаимодействие NO с супероксидным анион-радикалом способствует формированию токсичного пероксинитрита и дальнейшему повреждению мозга [Fabian R.H., 2008]. Доказано, что активации NOS способствуют Panx (паннексиновые каналы) астроцитов [Chekeni F.B., 2010]. При этом наблюдается одновременная активация макрофагов и микроглии в очаге поражения, что усугубляет тяжесть поражения. [Bargiotas P., 2012]. При подавлении экспрессии Panx1 и Panx2 выраженность неврологической дисфункции редуцируется [Bargiotas P., 2012].

4. *Нейровоспаление*

В течение 3–12 ч после реперфузии и реоксигенации начинается воспалительная реакция, индуцированная свободными радикалами и высоким уровнем внеклеточного глутамата. Наблюдается последовательная активация про- и противовоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей альфа (TNF- α) и интерлейкины (-1, -6, -8, -10) [Leonardo C.C., 2009; Ziemka-Nalecz M., 2017]. В самом начале доминирует противовоспалительный эффект, однако при продолжающихся нарушениях либо тяжелой и длительной гипоксии-ишемии превалируют эффекты провоспалительных цитокинов и запускаются процессы программированной гибели клеток с участием рецепторов фактора некроза опухолей (TNF- α , FasL, FasR, DR5), молекул лейкоцитарной клеточной адгезии (ALCAM), ионов кальция, глутамата, свободных радикалов [Morgun A.V., 2013; Jellema R.K., 2013]. Продукты деградации клеточных макромолекул инициируют дополнительную активацию инфламماسом, что способствует прогрессии нейровоспаления. Установлено, что воспалительные изменения в очаге гипоксии-ишемии поддерживаются на протяжении нескольких месяцев. Они причастны к увеличению объема поражения мозга и усилению тяжести состояния в отдаленном периоде [Winerdal M., 2012].

5. *Активация апоптоза*

Апоптоз клеток нейрональной природы характеризуется тем, что он начинается, как правило, с разрушения синаптических ансамблей, сопровождается изменениями ионного гомеостаза нейронов и дисрегуляторными событиями, связанными с нарушением рецепции нейротрансмиттеров и нейрон-глиальных взаимодействий. Это сложный контролируемый процесс, инициируемый физиологическими и патологическими стимулами [Salmina A.B., 2008].

Индукция апоптоза происходит как в ишемическую фазу, так и в фазу реперфузии при участии различных механизмов и способствует повреждению головного мозга. В начальном периоде гипоксии-ишемии

отмечается относительно невысокое количество апоптотических клеток, что может свидетельствовать о торможении процесса апоптоза и превалировании некроза в результате действия повреждающего фактора высокой интенсивности. Через 12-24 ч отмечается увеличение интенсивности апоптоза, что связывают с изменением доступности энергетических субстратов [Salmina A.B., 2008; 2009; Golosnaya G.S., 2010]. При этом в первую очередь страдают нейроны, в меньшей степени – астроциты. Такое состояние длится до 7 суток [Salmina A.B., 2006].

Интересным и неоднозначным является влияние транскрипционного фактора HIF-1. Он является одним из ключевых регуляторов патофизиологических ответов на гипоксию. С одной стороны, активация HIF-1 имеет нейропротективное действие, с другой - оказывает нейротоксическое действие. В нормальных условиях HIF-1 участвует в энергетическом метаболизме (увеличивая экспрессию транспортеров глюкозы и ферментов гликолиза), эритропоэзе (через индукцию эритропоэтина), ангиогенезе (стимулирует экспрессию VEGF), расширении сосудов (влияние на перicytes). Нейротоксическое действие HIF-1 реализуется путем участия в индукции апоптоза за счет стабилизации активации клеточного опухолевого антигена p53, уменьшения синтеза трофических факторов и угнетения пролиферации клеток. Кроме того, HIF-1 участвует в развитии некроза клеток, стимулируя проникновение кальция в клетки, а также усугубляет отек мозга в зоне повреждения путем увеличения проницаемости гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) [Fan X., 2010].

6. Подавление синтеза и активности факторов роста

Помимо наличия воспалительной активности в головном мозге, вместе с избыточной продукцией прооксидантных соединений, таких, как пероксинитрит, после перенесенной гипоксии-ишемии наблюдается подавление образования нейротрофических факторов и угнетение нейрогенеза. Поскольку способность мозга восстанавливаться после гипоксии-ишемии может зависеть от синтеза и активности

нейротрофических и стимулирующих факторов роста, то подавление эффектов этих факторов играет важную роль в поддержании повреждения головного мозга (до нескольких недель), например, после перинатальной гипоксии-ишемии [Fan X., 2010].

К основным физиологическим трофическим факторам относятся мозговой фактор роста нервов (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF). Трофические факторы играют множественную роль в ЦНС: регулируют функции нейронов и астроцитов, стимулируют миграцию клеток-предшественников, дифференцировку развивающихся нейронов и глиальных клеток, обеспечивают трофику и защиту поврежденных нейронов [Golosnaya G.S., 2010].

Вместе с тем, уже в заключение этой фазы начинают инициироваться события, связанные с репарацией повреждения (нейрогенез, синаптогенез, ангиогенез), что связано с формированием локального микроокружения (за счет скоординированной экспрессии цитокинов и факторов роста), необходимого для пролиферации, миграции и дифференцировки клеток. Так, например, происходит активация Wnt-сигналинга (сигнальный путь Wnt – один из внутриклеточных сигнальных путей животных, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей), имеющего огромное значение в регуляции пролиферации, дифференцировки и миграции клеток-предшественниц в головном мозге после ишемического повреждения, т.е. за счет усиления нейрогенеза [Lie D.C., 2005; Rijsewijk F., 1987]. Зафиксирована также активация ангиогенеза и усиление пролиферации и созревания эндотелиоцитов за счет Notch-сигналинга (сигнальный путь Notch является эволюционно консервативным внутриклеточным путём передачи сигнала и регулирует взаимодействия между соседними клетками. У дрозофилы взаимодействия Notch с лигандами включает внутриклеточный путь передачи сигнала, который играет ключевую роль в развитии. Представители этого семейства

имеют характеристики, сходные с внеклеточным доменом фактора роста эпидермиса (EGF) [Zen A.A.H., 2009; Shimada I.S., 2011; Del Zorro G. J., 2009]. В фазу реперфузии основными эффектами успешной фармакологической коррекции повреждения следует считать нормализацию внутриклеточного гомеостаза кальция и функции митохондрий, подавление окислительного стресса, контролируемое течение апоптоза, коррекцию нейровоспаления и индукцию процессов репарации клеток [Моргун А.В., 2013].

Фармакологическая коррекция гипоксически-ишемического повреждения головного мозга

В фазе гипоксически-ишемического повреждения ключевой становится задача поддержания энергетических механизмов нервных клеток, улучшения внеклеточного транспорта кислорода и питательных веществ, устранение в зоне повреждения лактацидоза, ограничение генерации активных форм кислорода и индуцируемых ими процессов свободнорадикального и перекисного окисления липидов, активация экстренных механизмов нейрональной пластичности и нейротрофических факторов [Новиков В.Е., 2014].

В фазе ишемически-реперфузионных повреждений особую роль играют антиоксиданты, корректоры микроциркуляции и цереброваскулярные средства, а также ноотропные средства, стимулирующие процессы нейрореабилитации [Скворцова В.И., 2006].

В РФ основной группой препаратов, используемых для лечения последствий повреждений ЦНС, являются ноотропные средства, составным элементом нейротропного действия которых является также и нейропротекторная активность [Денисов И.Н., 2013]. В настоящее время выделяют несколько классов ноотропных средств [Путилина М.В., 2006].

1. Производные пирролидона (пирацетам, фонтурацетам, пирацетам + циннаризин)
2. Препараты нейроаминокислот
 - 2.1. Производные ГАМК (никотиноил гамма-аминомасляная кислота, аминифенилмасляная кислота)
 - 2.2. Глицин и его производные (глицин)
3. Производные витаминов (пиритинол, гопантенвая кислота)
4. Производные янтарной кислоты (ацетиламиноянтарная кислота, янтарная кислота+ рибофлавин+ никотинамид+ инозин)
5. Препараты, содержащие нейропептиды и их аналоги (полипептиды коры головного мозга скота, депротеинезированный гомодериват крови телят, концентрат пептидов из головного мозга свиньи, метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин)
6. Предшественники фосфолипидов (цитиколин)
7. Непрямые холиномиметики
 - 7.1. Предшественники ацетилхолина (холина альфосцерат, деанола ацеглумат)
 - 7.2. Антихолинэстеразные средства (галантамин, ривастигмин).

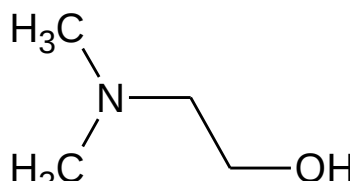
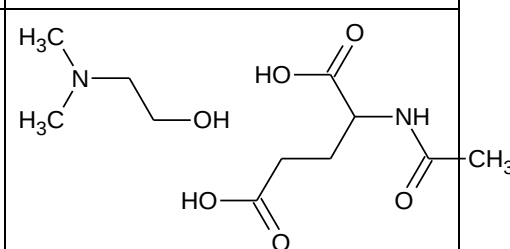
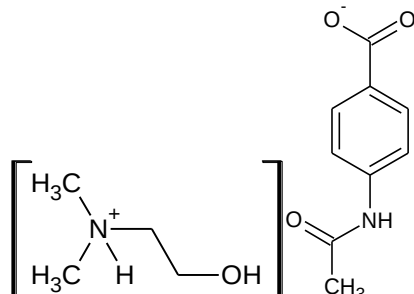
Доказанность эффективности нейропротекторов остается на невысоком уровне. После проведения ряда мета-анализов клинических исследований (КИ) в качестве одного из наиболее эффективных средств рассматривается цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин), который является предшественником ацетилхолина и участвует в синтезе фосфолипидов мембран клетки. Проведено 3 мета-анализа КИ цитиколина при ишемической инсульте [Clark W.M. et al. 1999; Dávalos A. et al. 2002; Alvarez X.A. et al. 1999]. Показано, что по данным нейровизуализации, при назначении препарата был существенно снижен объем пораженных тканей головного мозга, также отмечено некоторое влияние на восстановление утраченных функций и показатель ранней смерти. Эффективность цитиколина отмечена в Европейских рекомендациях по лечению инсульта и транзиторных

ишемических атак, разработанных Европейской организацией по борьбе с инсультом в 2008 г. [ESO, 2008].

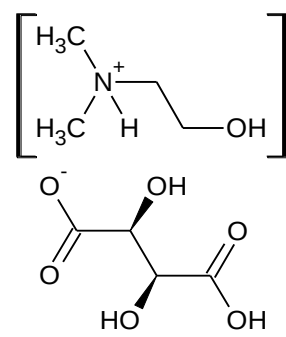
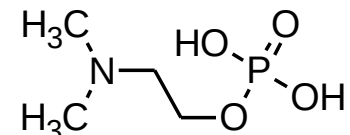
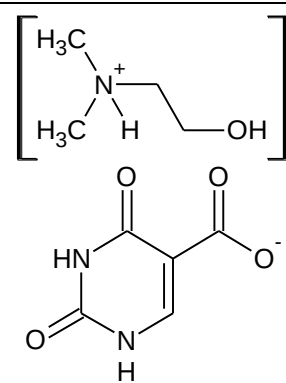
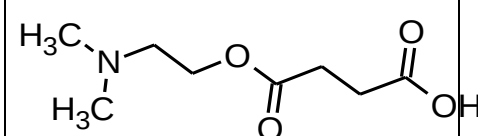
1.2.1 Производные аминоэтанола

Одной из перспективных групп нейропротекторных и ноотропных средств являются производные аминоэтанола. На сегодняшний день ряд производных аминоэтанола, в частности, соли и эфиры диметиламиноэтанола (ДМАЭ), активно используются в неврологической практике в различных странах (Таблица 1).

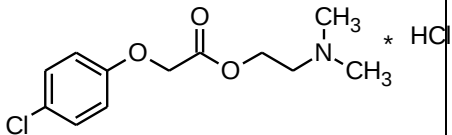
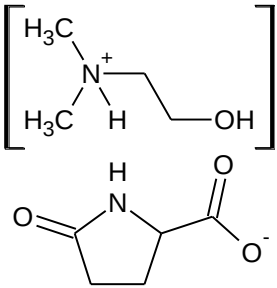
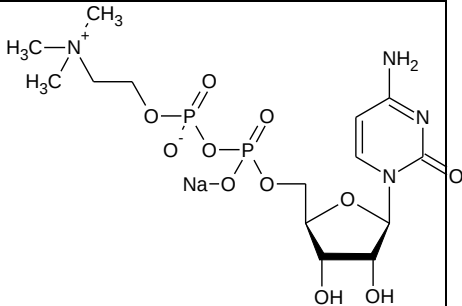
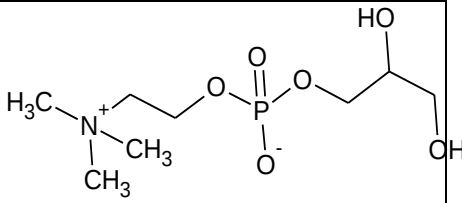
Таблица 1 – Некоторые производные аминоэтанола, используемые в клинической практике

№ п/п	Химическое название	Торговое название	Химическая формула
1.	2-Диметиламиноэтанол	Диметил- аминоэтанол (Деанол)	
2.	2-Диметиламиноэтанол, 2-(ацетиамидо)пентандиовая кислота (Диметиламиноэтанола ацеглумат)	Нооклерин	
3.	<i>N,N</i> -диметил-2- гидроксиэтанаминия 4-ацетиамидобензоат (Диметиламиноэтанола п-ацетиамидобензоат)	Деанер	

Продолжение таблицы 1

№ п/п	Химическое название	Торговое название	Химическая формула
4.	<i>N,N</i> -диметил-2- гидроксиэтанаминия (2 S,3S)-3-карбокси-2,3- дигидроксипропаноат (Диметиламиноэтанола битартрат)	-	
5.	2- (диметиламино)этилдигид- рофосфат (N,N- Диметиламиноэтанола монофосфат)	Панкар (Панклар)	
6.	<i>N,N</i> -диметил-2- гидроксиэтанаминия 2,4- диоксопиримидин-5- карбоксилат (Диметиламиноэтанола оротат)	Диметил- аминоэтанол оротат	
7.	4-[2- (диметиламино)этилокси]-4- оксобутаноат (Диметиламиноэтанола сукцинат)	Яктон	

Продолжение таблицы 1

№ п/п	Химическое название	Торговое название	Химическая формула
8.	[2-(диметиламино)этил]-2-(4-хлорфенилокси)ацетат гидрохлорид (Диметилэтаноламин п-хлорофеноксиацетат гидрохлорид)	Ацефен	
9.	<i>N,N</i> -диметил-2- гидроксиэтанаминия 5- оксопирролидин-2- карбоксилат (Диметиламиноэтанол пироглутамат)	-	
10.	5'-О-[гидрокси({гидрокси[2-(триметиламмоний)этокси]фосфорил} окси)фосфорил]цитидин (Цитиколин)	Цераксон	
11.	2,3-дигидроксипропил 2-(триметиламмоний)этил- фосфат (Холина альфосцерат	Глиатилин	

По мнению большинства авторов, ДМАЭ проникает через гематоэнцефалический барьер, захватывается нейронами и клетками нейроглии, и непосредственно в нейронах метилируется до холина, включающегося в синтез ацетилхолина – одного из основных нейромедиаторов, участвующих в процессах обучения и памяти [Кароог V.K., 2009]. Даже незначительного добавочного количества холина достаточно, для насыщения процесса образования ацетилхолина, а его избыток может использоваться для синтеза фосфолипидов [Haubrich D.R., 1975; Ansell G.B., 1977; Haubrich D.R., 1977].

В то же время, некоторые авторы предполагают, что для ДМАЭ прекурсорный холиномиметический эффект не является ведущим. Например, в исследовании Weineret W. J. et al., проведённом на морских свинках, которым предварительно вводился амфетамин, он не продемонстрировал центрального холиномиметического действия [Weiner W.J., 1976]. Также, показано, что деанол, в отличие от холина, не вызывает периферических холиномиметических эффектов [Davis K.L., 1976].

При повреждении нейронов эффект ДМАЭ может реализовываться за счет включения дополнительных механизмов действия:

- 1) увеличения в головном мозге количества свободного холина, доступного для синтеза ацетилхолина, регулируя его высвобождение из фосфолипидов за счет кальций-зависимой обменной реакции [Freeman J.J., 1976];
- 2) снижения проницаемости гематоэнцефалического барьера для холина, уменьшая его «отток» из головного мозга [Cornford E.M., 1978];
- 3) непосредственно взаимодействуя с холинергическими рецепторами или же стимулируя выброс ацетилхолина [Pomeroy A.R., 1972; Kostopoulos G.K., 1975];
- 4) повышая уровень холина в плазме [Dahlberg L., 1977], который в свою очередь может увеличивать или уменьшать количество доступного

субстрата для синтеза ацетилхолина в головном мозге [Cohen E.L., 1975; Haubrich D.R., 1975];

5) стимулируя синтез холина в печени (в форме фосфатидилхолина), увеличивая, таким образом его поступление в плазму в свободном виде или в форме фосфатидилхолина [Ansell G.B., 1971; Illingworth D.R., 1972; Jope R.S., 1979a]. Также возможно превращение ДМАЭ в печени в фосфатидил-N,N-диметилэтанолмин и его производные, которые могут быть в дальнейшем метилированы или гидролизваны с образованием холина в плазме или головном мозге [Jope R.S., 1979b];

6) некоторые производные ДМАЭ (диметилэтанолмина п-хлорофеноксидацетат) при введении старым крысам способны приводить к улучшению синаптических морфометрических параметров, приближая их к значениям молодых животных [Giuli C., 1980];

7) уменьшая процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижая образование малонового диальдегида (МД), лизофосфолипидов и повышая активность супероксиддисмутазы (СОД) и уровень восстановленного глутатиона (GSH) в тканях [Karen E., 2002];

8) фосфорилируясь и встраиваясь в мембранную структуры в форме фосфатидил-диметиламиноэтанола [Miyazaki I., 1976]. Его кратковременное применение оказывает прямое влияние на текучесть мембраны, в то время как длительное - приводит к накоплению в ней фосфатидил-диметиламиноэтанола, который ведет себя как скэвенджер гидроксильных радикалов [Nagy I.Z., 1986]. Это, вторично может приводить к увеличению текучести мембраны, снижающейся при активации ПОЛ [Bruch R.C., 1983].

Диметиламиноэтанол изучался при синдроме дефицита внимания и гиперактивности (СДГ). Так, в исследовании с участием 125 пациентов в возрасте от 6 месяцев до 20 лет (у 17 из них была эпилепсия) оценивалась возможность использования ДМАЭ при гиперактивности, раздражительности, проблемах с концентрацией внимания и социальной

адаптации на фоне безуспешности лечения транквилизаторами, антипсихотиками и седативными препаратами. Доза ДМАЭ постепенно титровалась до 20-200 мг/сут, средняя для большинства пациентов составила 50 мг/сут. Длительность приема препарата была не менее 4-х недель, а 74 участника исследования продолжали принимать его в течение нескольких месяцев.

В результате у 68% пациентов, не имевших эпилепсии, улучшилась успеваемость в школе, снизилась утренняя гиперреактивность и раздражительность, у некоторых произошла нормализация аппетита. Среди пациентов с эпилепсией улучшение состояния произошло у 65% [Oettinger L., 1958].

Поскольку ДМАЭ является предшественником ацетилхолина, была протестирована его эффективность в лечении различных заболеваний, связанных с недостатком ацетилхолина, таких как поздняя дискинезия, болезнь Альцгеймера, возрастные амнестические расстройства, когнитивные нарушения и синдром Туретта. Так, в исследовании на 27 пациентах (средний возраст испытуемых $73 \pm 7,4$ года), страдавших болезнью Альцгеймера, оценивалась эффективность препарата, назначаемого по 300 мг/сут с постепенным титрованием дозы до 1800 мг/сут. Длительность лечения составила 2 месяца [Fisman M., 1981]. В результате исследования у больных не было отмечено достоверного улучшения состояния. По мнению авторов, это может быть обусловлено тем, что участники эксперимента находились на той стадии заболевания, при которой уже сложно добиться каких-либо результатов.

Деанола ацеглумат представляет собой не соль диметиламиноэтанола, а его комбинацию с N-ацетил-L-глутаминовой кислотой. Предполагается, что в такой комбинации холинотропное действие ДМАЭ будет дополняться глутаматергическим действием N-ацетил-L-глутаминовой кислоты, что приведет к улучшению когнитивных функций [Levin E.D., 1995; Александровский Ю.А., 2004].

Введение ДМАЭ ацеглумата белым крысам в различных дозах при билатеральной окклюзии общих сонных артерий способствовало увеличению их выживаемости, причем наиболее эффективными оказались дозы 10, 20 и 50 мг/кг, увеличивающие выживаемость по сравнению с контролем с 20 % до 80, 70 и 60% соответственно [Макарова Л.М., 2006]. Это действие может быть обусловлено антигипоксической активностью ДМАЭ [Malanga G., 2012; Макарова Л.М., 2006].

ДМАЭ ацеглумат препятствует подавлению биоэлектрической активности мозга в период ишемии и активирует восстановление суммарной мощности и максимальной амплитуды в период реперфузии. Введение препарата в условиях острой ишемии мозга ограничивает развитие фазы реактивной гиперемии и нивелирует фазу гипоперфузии. Также в условиях ишемических повреждений мозга ДМАЭ препятствует накоплению как первичных, так и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в ткани мозга [Макарова Л.М., 2006].

Параацетамидобензоатная соль ДМАЭ использовалась для лечения проблем с обучением и поведенческих расстройств [Stenbäck F., 1988]; болезни Гентингтона, [De Silva L., 1977; Tammenmaa I., 2000]; синдрома хронической усталости; неврастении [American Hospital Formulary Service, 1984; цит. по HSDB, 1996].

В небольшом исследовании у 9 пациентов с хореей Гентингтона, поздней или постгемиплегической дискинезией ДМАЭ использовался в дозе 1000 мг/сут в течение 1-го месяца, 2000 мг/сут во 2-й месяц с последующим чередованием еще 2-х циклов. По окончании исследования статистически значимых результатов получено не было, что авторы объяснили возможными органическими изменениями в стриатуме и снижением плотности М-холинорецепторов в головном мозге [Tarsy D., 1977]. Еще одной причиной неудачи могло стать использование недостаточной дозы препарата, так как для лечения хореоформных расстройств ДМАЭ использовали в значительно больших дозах 200 мг/кг/сут [Davis K.L., 1976; Growdon J.H., 1977].

В отличие от других производных, ДМАЭ тартрат и битартрат применялись в основном у здоровых добровольцев. В исследовании на 50 здоровых мужчинах препарат в комбинации с экстрактом женьшеня, витаминами, минералами и микроэлементами увеличивал работоспособность, снижал потребление кислорода, выраженность лактацидоза и частоту сердечных сокращений при одинаковом уровне нагрузки по сравнению с плацебо [Pieralisi G., 1990]. Одним из возможных механизмов действия препарата может быть его способность нейтрализовывать избыток свободных радикалов [Malanga G., 2012].

Применение ДМАЭ тартрата у 35 здоровых мужчин в дозе 10-30 мг приводило к увеличению мышечного тонуса, улучшение ментальной концентрации, снижению потребности во сне и «ясному» пробуждению. Однако, авторы оценили данные эффекты как недостаточные вследствие слишком малой дозы препарата, взятой в исследовании [Murphree H.B., 1960]. Кроме того, тартраты – не лучшие соли для создания лекарственных препаратов ввиду их малой диссоциации, а, значит, слабой абсорбции активного вещества.

ДМАЭ парахлорфеноксиацетат и его гидрохлориды показали определенную эффективность при лечении травм головного мозга, посттравматических расстройств, хронического алкоголизма, отравлении барбитуратами, а также повышение умственной работоспособности у пожилых людей [Schmidt H., 1970; Vojtechovsky M., 1969; Herrschaft H., 1974; Nagy I.Z., 2002].

Введение препарата старым крысам в дозе 100 мг/кг/сут в течение 6 недель или 100 мг/кг 3 раза в неделю в течение 5 месяцев приводило в первом случае к увеличению средней длины синаптических контактов, при неизменности их численной плотности, а во втором - к замедлению снижения плотности синаптических контактов при старении, при отсутствии изменений их средней длины [Bertoni-Freddari C., 1982].

В эксперименте на крысах изучали влияние перорально вводимого диметиламиноэтанола пироглутамата (DMAEp-Glu) на уровень ацетилхолина и холина в префронтальной коре головного мозга на фоне предварительно введенного неостигмина. Было обнаружено, что спустя 4 часа после введения DMAEp-Glu в дозе 10 мг/кг в префронтальной коре головного мозга уровень ацетилхолина снижался на 20% по сравнению со значениями контрольной группы. В дозах 40 мг/кг и 160 мг/кг уровень медиатора оставался неизменным, а дозировки 640 мг/кг и 1280 мг/кг давали достоверно значимое его увеличение на 68% и 91%, соответственно. При этом уровень холина дозозависимо повышался у всех групп, получавших DMAEp-Glu.

Оценка фармакологической активности соединения на крысах в тесте пассивного избегания и в водном лабиринте Морриса продемонстрировала достоверное улучшение когнитивных функций при использовании доз 320 и 640 мг/кг без увеличения эффекта при их наращивании [Blin O., 2009].

В контролируемом клиническом исследовании у 24 здоровых молодых мужчин было изучено влияние перорального 7-дневного приема DMAEp-Glu в дозе 1500 мг/сут на выраженность когнитивных расстройств, вызванных внутривенной инъекцией 0,5 мг скополамина. Полученные результаты показали возможность уменьшения препаратом негативного влияния скополамина на долговременную память и позволили авторам предположить возможность его использования у больных с когнитивными нарушениями [Blin O., 2009].

Описано клиническое применение ДМАЭ монофосфата в качестве психостимулятора в психоневрологической практике.

У крыс ДМАЭ оротат, вводимый в дозе 10 мг/кг в течение 6 месяцев, вызывал снижение уровня холестерина и триглицеридов плазмы без каких-либо проявлений стеатоза печени [Karen E., 2002].

Показана возможность применения ДМАЭ гемисукцината в качестве средства коррекции возрастных нарушений ЦНС [Karen E., 2002].

Цитиколин является аналогом естественного для организма соединения - цитидин 5'-дифосфохолина. В значительной мере этому соединению присущи свойства, характерные для производных аминокэтанола, но в дополнение к общим компонентам механизма действия ДМАЭ, для него специфично:

1) уменьшение высвобождения глутамата в экстрацеллюлярное пространство [Hurtado O., 2005];

2) снижение активации фосфолипазы A_2 в клеточных мембранах и митохондриях, уменьшение уровня арахидоновой кислоты и свободных жирных кислот после реперфузии в мозге [Adibhatla R.M., 2003];

3) увеличение синтеза восстановленного глутатиона за счет превращения в холин-S-аденозил-L-метионин [Adibhatla R.M., 2001];

4) ослабление или предотвращение апоптоза, путем влияния как на внутренний, так и на внешний апоптотические пути [Morton C.C., 2013];

5) стимуляция нейрогенеза [Diederich K., 2012];

6) активация ангиогенеза через усиление экспрессии сосудистого фактора роста (VEGF) [Gutierrez-Fernandez M., 2012]. Данный эффект может быть связан с активацией субстрата инсулинового рецептора-1 (Insulinreceptorsubstrate-1, IRS-1) – модулятора дифференциации клеток сосудистого эндотелия [Rosell A., 2013], вносящего вклад в экспрессию VEGF [Ferrara N., 2001];

7) N-ацетил-аспартат (NAA) – важный метаболит, расположенный, в основном, в пирамидальных нейронах. NAA, вовлеченный в процессы нейрональной пластичности, аксон-глиальной передачи, энергообразования в митохондриях и метаболизма миелина, рассматривается как суррогатный маркер целостности и жизнеспособности нервных клеток [Moffett J.R., 2007]. Прием цитиколина метамфетамин-зависимыми пациентами в течение 4 недель в дозе 2000 мг/сутки, приводил к устойчивому увеличению уровня NAA (а также холина) в префронтальной коре после 2-ой и 4-ой недель лечения [Yoon S.J., 2010].

На экспериментальных моделях фокальной и глобальной ишемии головного мозга цитиколин оказывал эффекты на различных стадиях ишемического каскада [Kakihana M., 1988; Schabitz W.R., 1996; Hurtado O., 2008]. В комбинации с рекомбинантным тканевым активатором плазминогена (r-tPA) или же самостоятельно он уменьшал выраженность неврологического дефицита и объем церебрального повреждения у испытуемых животных [De Lecinana A.M., 2006; Önal M.Z., 1997]. Мета-анализ 14 экспериментальных исследований ишемического инсульта (522 животных, 280 получали цитиколин и 242 - контроль) подтвердил способность цитиколина достоверно снижать объем повреждения у животных, как на моделях перманентной, так и временной ишемии [Bustamante A., 2012].

При этом ряд авторов отметили дозозависимость эффектов цитиколина, показав, что высокие дозы в большей степени обеспечивают уменьшение объема инфаркта головного мозга и снижение неврологических симптомов [Hurtado O., 2005; Takasaki K., 2011]. В то же время, другие исследователи установили его одинаковую эффективность как в низких (≤ 250 мг/кг) так и в высоких дозах (≥ 250 мг/кг) [Bustamante A., 2012]. Стоит также отметить, что цитиколин лучше снижает выраженность ишемии головного мозга при многократных введениях [Bustamante A., 2012].

Нейропротекторный эффект цитиколина был продемонстрирован при различных заболеваниях и поражениях ЦНС, таких как острая и хроническая церебральная ишемия, интрацеребральная геморрагия, глобальная гипоксия головного мозга и различные нейродегенеративные заболевания [Shuaib A., 2000; Secades J.J., 2006; Cho H.J., 2009; Davalos A., 2011; Alvarez-Sabin J., 2013]. В большинстве клинических исследований препарат снижал выраженность неврологической симптоматики [Tazaki Y., 1988; Clark W.M., 1997, 1999, 2001]. Мета-анализ 4-х исследований (1372 пациента, 789 получали цитиколин и 583 – плацебо) продемонстрировал достоверное улучшение состояние пациентов (по критериям BI95, mRS1 и NIHSS1) через

3 месяца лечения препаратом в дозе 2 г/сут [Davalos A., 2011; Secades J.J., 2006; Clark W.M., 1997, 1999].

Одно из самых крупных исследований по цитиколину при ишемическом инсульте – исследование ICTUS, в котором приняло участие 2298 человек. Больные получали препарат внутривенно по 1000 мг каждые 12 ч в течение первых 3-х дней, а затем перорально 1000 мг 2 раза/сут на протяжении 6 недель. К сожалению, ни по летальности, ни по комбинированному показателю восстановления через 90 дней, достоверной разницы между группами плацебо и цитиколина выявлено не было. Тем не менее, объединение этих результатов с данными других исследований все же позволило отметить достоверное уменьшение степени инвалидизации в среднем на 14% по сравнению с плацебо [Davalos A., 2012].

Доклинические исследования показали, что у крыс холина альфосцерат увеличивает выброс ацетилхолина в гиппокампе, улучшает обучаемость и память, снижает выраженность когнитивного дефицита на экспериментальных моделях стареющего мозга и уменьшает скополамин-индуцированную амнезию. На фоне его применения у животных редуцировались микроанатомические изменения в головном мозге, и предотвращалось снижение плотности холинорецепторов [Amenta F., 2001].

Наиболее широко холина альфосцерат изучался у пациентов с деменцией различной этиологии. Так, в сравнительном исследовании с участием 565 пациентов с нейродегенеративной деменцией на фоне введения препарата (перорально 1200 мг/сут в течение 3-6 месяцев или внутримышечно 1000 мг/сут 3 мес) было отмечено улучшение состояния пациентов, особенно имевших нарушения памяти и концентрации внимания. По эффективности холина альфосцерат превзошел ацетил-L-аргинин. У 789 пациентов с сосудистой деменцией использование препарата улучшало память и концентрацию внимания, снижало выраженность аффективных и соматических расстройств. По шкале SCAG у этих больных холина альфосцерат оказался эффективнее цитиколина [Amenta F., 2001].

В контролируемом клиническом исследовании с участием 261 пациента с деменцией альцгеймеровского типа применение препарата по 1200 мг/сут сутки в течение 180 дней позволило получить достоверное улучшение (по сравнению с плацебо) по шкалам ADAS-Cog, ADAS-Behav, ADAS-Total MMSE, GDS и CGI [Moreno M.D.J.M., 2003].

В 3-х неконтролируемых клинических исследованиях у пациентов с острыми цереброваскулярными нарушениями использование препарата по 1000 мг/сут в течение 4 недель после острого события с последующим пероральным приемом по 1200 мг/сут на протяжении 5 месяцев позволило добиться улучшения когнитивных и двигательных функций [Amenta F., 2001].

Производные аминокислот традиционно считаются препаратами с хорошей переносимостью и высокой безопасностью. Так, применение ДМАЭ тартрата у здоровых добровольцев не приводило к статистически значимому изменению артериального давления, частоты сердечных сокращений, массы тела, уровня холестерина в крови, кислотности желудочного сока (однако, объем желудочного сока увеличивался) [Murphree H., 1960].

Однако, у больных с различной патологией частота развития побочных эффектов может сильно варьировать. В то время, как в одних исследованиях ДМАЭ практически не оказывал никаких нежелательных лекарственных реакций, не изменял показатели крови и мочи, не влиял на сердечно-сосудистую и дыхательную системы [Oettinger L., 1958], в других случаях его прием мог провоцировать назальную и оральную гиперсекрецию, диспноэ, сонливость, заторможенность и спутанность сознания [Karen E., 2002; Fisman M., 1981]. Эти эффекты, в значительной мере, являются дозозависимыми и уменьшаются при снижении дозы ДМАЭ.

Особого внимания заслуживает связь между применением ДМАЭ и риском развития аффективных расстройств. Janowsky D.S. et. al. выдвинули гипотезу, что холинергическая и адренергическая системы в ЦНС влияют на настроение, причем делают это реципрокно. В частности, доминирование

холинергических влияний в головном мозге может провоцировать депрессию, в то время как преобладание катехоламинергических или серотонинергических – манию. Такое предположение согласуется с результатами ряда клинических наблюдений [Janowsky D.S., 1972]. Показано, что холиноблокаторы могут иметь антидепрессивную активность [Safer D.J., 1971], а эффект трициклических антидепрессантов, помимо их адрено- и/или серотониномиметического действия, может быть обусловлен антихолинергическим действием [Maas J.W., 1975].

ДМАЭ, особенно в высоких дозах, может создавать дисбаланс между холино- и адренергическими влияниями в ЦНС за счет субстратного усиления холинергической передачи, что может приводить к нарушениям в настроении. Так, в исследовании Casey D.E. описаны аффективные нарушения на фоне приема ДМАЭ в дозе 1000-2500 мг/сут у 8 участников из 38, хотя у некоторых пациентов никаких побочных эффектов не наблюдалось и при достижении дозы в 6000 мг/сут. Эти побочные эффекты отмечались у людей с явной предрасположенностью к аффективным расстройствам (7 из 8). У пациентов со сниженным настроением они проявлялись депрессией, суицидальными мыслями, спутанностью сознания, асоциальными чертами поведения, вегетативными нарушениями, анорексией, диссомнией. В противоположность, у больных с исходной гипоманией возникали эйфория, повышенная двигательная активность, расстройства речи, снижалась потребность во сне, могли возникать признаки мании величия, гиперсексуальность и другие расстройства поведения. Очевидно, пациенты с аффективными расстройствами в анамнезе более восприимчивы к нейрохимическому дисбалансу в головном мозге, вызванному приемом лекарственных средств [Casey D.E., 1979].

Формирование депрессии на фоне ДМАЭ вполне укладывается в концепцию гиперактивации холинергических влияний в ЦНС при этом состоянии. Описано увеличение частоты возникновения депрессии у людей, часто соприкасающихся с фосфороорганическими инсектицидами -

ингибиторами ацетилхолинэстеразы [Gershon S., 1961] или принимающих лекарственные средства - ингибиторы ацетилхолинэстеразы [Rowntree D.W., 1950; Bowers M.B., 1964]. Более того, обратимый ингибитор АХЭ физостигмин, может устранять манию и вызывать депрессию у маниакально-депрессивных пациентов [Janowsky D.S., 1973b; Davis K. L., 1976], а также блокировать повышение настроения, активности и разговорчивости, вызванное введением психостимулятора метилфенидата [Janowsky D.S., 1973a].

Вышеперечисленные побочные эффекты ДМАЭ являются дозо-зависимыми. Негативные изменения настроения не фиксировались до тех пор, пока доза препарата не достигала 1000 мг/сут. При этом состояние больных улучшалось при снижении дозы. Описано развитие депрессии у двоих пациентов, принимавших 9000 мг холина ежедневно, которая полностью разрешилась после отмены препарата [Tamminga C., 1976].

Традиционно применение диметиламиноэтанола не рекомендуется при беременности, лактации, психических заболеваниях и судорожных состояниях [Karen E., 2002].

Материал раздела 1.2.1 подготовлен совместно с Сысоевым Ю.И.

1.2.2 Сукцинатсодержащие антигипоксанты

Антигипоксанты – группа лекарственных средств, основные эффекты и механизмы действия которых направлены на повышение переносимости гипоксии. В клинической практике применяются при ишемических состояниях различного генеза (ишемия миокарда, нарушения мозгового или периферического кровообращения, дыхательная недостаточность, шок любого генеза и т.д.). Большое количество лекарственных соединений проявляет в той или иной степени антигипоксическую активность, которая является важной частью их фармакологического действия.

Если рассматривать гипоксию как несоответствие энергопотребности клетки и энергопродукции в системе митохондриального окислительного фосфорилирования, то для улучшения энергетического статуса клетки может быть использовано несколько подходов [Оковитый С.В., 2012]:

- 1) повышение эффективности использования митохондриями дефицитного кислорода вследствие предупреждения разобщения окисления и фосфорилирования, стабилизации мембран митохондрий;
- 2) ослабление ингибирования реакций цикла Кребса, особенно поддержание активности сукцинатоксидазного звена;
- 3) возмещение утраченных компонентов дыхательной цепи;
- 4) формирование искусственных редокс-систем, шунтирующих перегруженную электронами дыхательную цепь;
- 5) экономизация использования кислорода и снижение кислородного запроса тканей либо ингибирование путей его потребления, не являющихся необходимыми для экстренного поддержания жизнедеятельности в критических состояниях;
- 6) увеличение образования АТФ в ходе гликолиза без увеличения продукции лактата;
- 7) снижение расходования АТФ на процессы, не определяющие экстренное поддержание жизнедеятельности в критических ситуациях;
- 8) введение извне высокоэнергетических соединений.

В медицинской практике широкое применение при гипоксии/ишемии нашли антигипоксанты, которые способны поддерживать активность сукцинатоксидазного звена. Это ФАД-зависимое звено цикла Кребса, позднее угнетающееся при гипоксии по сравнению с НАД-зависимыми оксидазами, которое может определенное время поддерживать энергопродукцию в клетке при условии наличия в митохондриях субстрата окисления – сукцината (янтарной кислоты (ЯК)) [Лукьянова Л.Д., 1991; Lukyanova L.D., 2015; Кондрашова М.Н., 1989].

Сукцинатсодержащие препараты снижают смертность, уменьшают тяжесть неврологических расстройств и агрессии, характерные для гипоксии, оказывают антистрессовое и нормализующее влияние на двигательную, исследовательскую и эмоциональную деятельность животных [Лукьянова Л.Д., 1976; Лукьянова Л.Д., 2009; Lukyanova L.D., 2015].

Вводимый извне сукцинат при курсовом применении оказывает умеренное антигипоксическое действие, однако его активность при воздействии экстремальных факторов является недостаточной. Отсутствие выраженного защитного действия может быть связано с низкой проницаемостью биологической мембраны для препарата [Лукьянова Л.Д., 1991]. Наиболее активно экзогенный сукцинат захватывается печенью, что сопровождается повышением ее детоксицирующей активности [Ивницкий Ю. Ю., 1998]. Биодоступность сукцината можно увеличить при комбинированном его введении с некоторыми метаболитами, способствующими лучшему его проникновению в клетку, в частности, с изолимонной, лимонной, яблочной кислотами [Лукьянова Л.Д., 2011].

Более перспективным, чем введение сукцината, для коррекции экстремальных состояний может быть повышение активности СДГ, активация эндогенного образования сукцината, в том числе за счет введения его предшественников, либо применения различных гетероциклических сукцинат-содержащих соединений, которые способствуют его проникновению в клетку [Лукьянова Л.Д., 1989]. Использование органических производных сукцината также способствует более хорошему проникновению его через биологические мембраны. При этом после поступления вещества в клетку происходит его диссоциация или отщепление молекулы сукцината. Основная часть молекулы может встраиваться в фосфолипидную мембрану, влияя на ее физико-химические свойства, а сукцинат используется непосредственно дыхательной цепью в качестве энергетического субстрата [Кондрашова М.Н., 1973].

К числу препаратов, влияющих на эффективность сукцинатзависимого звена энергопродукции, относят такие сукцинатсодержащие препараты как реамберин, цитофлавин, ремаксол, этилметилгидроксипиридина сукцинат.

Цитофлавин представляет собой комбинированный препарат, состоящий из янтарной кислоты, никотинамида, рибофлавина и инозина (рибоксина). Известно, что метаболическая энергокоррекция и антигипоксическая активность цитофлавина обусловлена взаимодополняющим действием его компонентов.

Рибофлавин является не только коферментом глутатионредуктазы, но также входит в состав дыхательных ферментов митохондрий (глутарил-КоАдегидрогеназы, саркозиндегидрогеназы, электрон переносящих флавопротеинов, НАДН-дегидрогеназы и других), которые способны обеспечить регенерацию НАД⁺ [Афанасьев В.В., 2010].

Никотинамид - это амидный метаболит никотиновой кислоты - прекурсор коферментов дегидрогеназ (НАД⁺ и НАДФ⁺). Соотношение НАДН/НАД⁺ является главным регуляторным механизмом цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и, отчасти, окислительного фосфорилирования. Предполагается, что входящий в состав никотинамид активирует НАД-зависимые ферментные системы, однако этот эффект менее выражен, чем у НАД.

За счет инозина достигается увеличение содержания общего пула пуриновых нуклеотидов, необходимых не только для ресинтеза макроэргов (АТФ и ГТФ), но и вторичных мессенджеров (цАМФ и цГМФ), а также нуклеиновых кислот. Определенную роль может играть способность инозина несколько подавлять активность ксантиноксидазы, уменьшая тем самым продукцию высокоактивных форм соединений кислорода [Афанасьев В.В., Лукьянова И.Ю., 2010; Саватеева-Любимова Т.Н., Лесиовская Е.Е., Сивак К.В., 2008].

Таким образом, терапевтический эффект цитофлавина проявляется в индуцирующем воздействии на активность ферментативного звена антиоксидантной защиты, а механизм восстановления антиоксидантной активности под воздействием цитофлавина основан на восстановлении пула низкомолекулярных антиоксидантов, тиолдисульфидного равновесия и активности тиолзависимых ферментов антиоксидантной защиты [Федин А.И., 2005].

В связи с указанными особенностями биологических эффектов активных компонентов цитофлавина, показаниями для применения указанного препарата являются комплексная терапия ишемического повреждения мозга и миокарда, коррекция гипоксии при острых отравлениях нейротропными ядами, дисциркуляторная энцефалопатия, хронические цереброваскулярные заболевания [Зарубина И.В., 2009; Зарубина И.В., 2010; Яснецов В.В., Просвинова Е.П., 2012].

Мексидол – сукцинат-2-этил-3-метил-3-оксипиридин сочетает антиоксидантные свойства основания (производное 3-оксипиридина) с антигипоксической активностью сукцината [Лукиянова Л.Д., 1990]. Мексидол повышает устойчивость организма к кислородозависимым патологическим состояниям (шоку, нарушениям мозгового кровообращения), улучшает мнестические функции, снижает токсическое действие алкоголя. Применение препарата в клинической практике связано с такими состояниями, как острые нарушения мозгового кровообращения, дисциркуляторные энцефалопатии, вегетососудистая дистония, атеросклероз мозговых сосудов, купирование абстинентного синдрома при алкоголизме и наркомании [Воронина Т.А., 2001]. Антигипоксическая активность мексидола в различных клинически значимых экстремальных состояниях оценивается как умеренная.

В условиях гипоксии препарат вызывает компенсаторную активацию аэробного гликолиза и уменьшает угнетение окислительных процессов в цикле Кребса с повышением содержания АТФ и креатинфосфата, активацией

энергосинтезирующей функции митохондрий, стабилизацией клеточных мембран. В присутствии мексидола отмечена активация сукцинатоксидазного пути окисления, которая в условиях ограничения НАД-зависимого окисления на ранних стадиях гипоксии позволяет сохранить способность цитохромного участка дыхательной цепи к образованию энергии [Левченкова О.С., 2012].

Мексидол, как и другие производные янтарной кислоты, в условиях гипоксии сохраняет и восстанавливает уровень адениловых нуклеотидов, никотинамидных коферментов, креатинфосфата, стимулирует активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, ацетилхолинэстеразы, активирует при гипоксии анаэробный гликолиз, способствует восстановлению митохондриальных окислительно-восстановительных процессов, нормализует соотношение холестерол/липопротеины высокой плотности в мембранных структурах, что является весьма существенным для поддержания энергообеспечения и физической работоспособности. [Лукиянова Л.Д., 2009; Воронина Т.А., 2012; Шустов Е.Б., Оковитый С.В., 2015].

1.2.3 Рецепторные механизмы действия сукцината

Для ряда кислот цикла Кребса – янтарной, фумаровой и кетоглутаровой идентифицированы специфические GPCR-рецепторы [Шустов Е.Б., Оковитый С.В., 2015].

Сукцинатом возбуждаются GPR91-рецепторы. В новом обозначении, связанном с идентифицированными эндогенными лигандами, эти рецепторы получили обозначение SUCNR1. Они сопрягаются с G_i , G_q/G_{11} белками, локализованы в жировой ткани, печени, сердце, нейронах сетчатки, кишечнике, селезенке, дендритных клетках, почках, тромбоцитах. В обычных

условиях уровень циркулирующего в крови сукцината в 8-10 раз ниже порога срабатывания рецепторов. Накопление внеклеточного сукцината, прежде всего, связано с его утечкой из митохондрий, что встречается при глубоких степенях клеточных повреждений, гипоксии, свободнорадикальных процессах, митохондриальной дисфункции и разобщении окисления-фосфорилирования. Сукцинат накапливается внеклеточно при ишемии и гипергликемии, что позволяет при хроническом воздействии этих патологических состояний превысить уровень чувствительности рецепторов. Следовательно, GPR91-рецепторы могут рассматриваться как сенсоры клеточных стресс-индуцированных повреждений и гипоксии [Blad C.C. et al., 2012].

Экспрессия мРНК и белка GPR91 была показана в кортикальных нейронах и астроцитах, но отсутствовала в эндотелиальных клетках мозга мышей [Hamel D. et al., 2014]. Активация GPR91 в нервной ткани, как в норме, так и при гипоксии/ишемии, была связана со стимуляцией ангиогенеза. У новорожденных интактных мышей введение сукцината внутрь мозговых желудочков увеличивало экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), достигает максимального уровня через 24 часа.

Инкубация *in vitro* эксплантов коры головного мозга с янтарной кислотой также увеличивала плотность микрососудов в препаратах мозга мышей дикого типа [Hamel D. et al., 2014].

На модели ишемии мозга было показано, что в зоне пенумбры уровень сукцината увеличивался в 3 раза через 90 мин ишемии и сохранялся повышенным около 60 мин у мышей дикого типа и GPR91- null мышей. Ишемия вызывала значимое снижение плотности сети сосудов через 24 ч у GPR 911-дефицитных мышей и дикого типа. Однако через 96 ч после ишемического воздействия плотность сосудов в зоне пенумбры увеличивалась только у мышей дикого типа, а зона инфаркта была в 3 раза меньше в сравнении с GPR91-дефицитными животными. Введение сукцината в желудочки мозга перед ишемическим воздействием уменьшало зоны очага

инфаркта и пенумбры на 50% через 96 часов у мышей дикого [Hamel D. et al., 2014].

Таким образом, кратковременное увеличение уровня сукцината при гипоксии/гипоперфузии мозга и непродолжительная активация GPR91 необходимы в поддержании нормальной васкуляризации и формирования нейроадаптивных ответов.

В почках рецепторы выявлены в приносящих артериолах почечных клубочков и в юкстагломерулярном аппарате. Они участвуют в регуляции секреции ренина (следовательно, запускают каскад ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, что может привести к повышению артериального давления) и клубочковой фильтрации [Peti-Peterdi J., 2010; Peti -Peterdi J., 2013; Toma I. et al., 2008]. Экспериментально показано, что при введении экзогенного сукцината может повышаться уровень артериального давления, который нормализуется блокаторами рецепторов ангиотензина. GPR91-рецептор в почках при возбуждении запускает механизм внутриклеточной мобилизации кальция, фосфорилирования внеклеточно регулируемой киназы (ERK)1/2, активизации каскада арахидоновой кислоты с образованием простаглицина и простаглицина E2. Активация почечных рецепторов сукцинатом, увеличивает реабсорбцию фосфата и глюкозы, стимулирует глюконеогенез.

В сетчатке сукцинатные рецепторы участвуют в индуцированном гипоксией ангиогенезе, усиливая экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста. В дендритных клетках возбуждение SUCNR1-рецепторов активирует хемотаксис иммунных клеток и продукцию провоспалительных цитокинов [He W. et al., 2004]. В связи с этим высказано предположение, что антагонисты SUCNR1 могут быть полезны для профилактики и лечения почечной гипертензии, диабетической нефропатии и диабетической ретинопатии, аутоиммунных заболеваний.

В работе [Aguilar C.J., 2014] показано, что в условиях острой или хронической ишемии миокарда сукцинат посредством SUCNR1-рецептора

запускает фосфорилирование внеклеточного домена сигнал-регулирующей киназы (ERK1/2), повышение внутриклеточного содержания кальция и цАМФ, экспрессию гена кальций-кальмодулин-зависимой протеинкиназы II δ (CaMKII δ), транслокации гистондеацетилазы 5 (HDAC5) в цитоплазму, что является внутриклеточным сигналом для запуска процессов гипертрофии миокарда. Этот эффект связан с сигнальной цепью ядерных протеинкиназ PI3K/Akt [Tonack S. et al., 2013]. Под влиянием сукцината повышается сердечный выброс, при ишемии миокарда рецепторы участвуют в запуске процессов апоптоза.

В гемопоэтических прогениторных клетках сукцинатные рецепторы индуцируют клеточную пролиферацию и защиту от апоптоза. В результате у пациентов с миелодепрессией ускорялся процесс восстановления уровня гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов [Шустов Е.Б., Оковитый С.В., 2015].

Сукцинат стимулирует хемотаксис дендритных клеток и развитие моноцитов, выступает синергистом в отношении провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухолей) [Шустов Е.Б., Оковитый С.В., 2015].

Сукцинатные рецепторы участвуют в регуляции секреции эндотелиального сосудистого фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF1- α), что обеспечивает повышение устойчивости тканей к гипоксии [Chen H. et al. 2014; Lukyanova L.D., 2015].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были выбраны: соединение бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4- оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоат. (2:1) (ФДЭС) - синтезировано на кафедре органической химии СПХФУ, цитофлавин (ООО «НТФФ ПОЛИСАН», Россия) [Афанасьев В.В., 2010, Бульон В.В., 2004], 1,2,4-тиадиазол-3,5-диамин (амтизол) - синтезирован на кафедре фармакологии ВМедА им. С.М.Кирова [Лукьянова Л.Д., 1990] , цитиколин (Феррер Интернасьональ, С.А., Испания) [Secades J. J., 2006; Clark W.M., 1997, 1999], холина альфосцерат (Italfarmaco S.p.A., Италия) [Amenta F., 2004], пирацетам (UCB Pharma S.A., Бельгия) [Николаева И.Г., 2010].

Бис{2-[(2E)-4- гидрокси-4- оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоат и референсные препараты вводили внутрижелудочно 1 раз в день за 40 минут до начала экспериментов однократно или курсом (1-3 недели). Животные контрольной группы получали 0,9% раствор NaCl в эквивалентных количествах.

Объекты исследования

Соединение бис{2-[(2E)-4- гидрокси-4- оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоат (2:1) (ФДЭС) (Патент на изобретение №2588365) синтезированное на кафедре органической химии СПХФУ (Рисунок 2).

ФДЭС представляет собой белый порошок, без запаха, хорошо растворимый в воде, молекулярная масса составляет 548 г/моль.

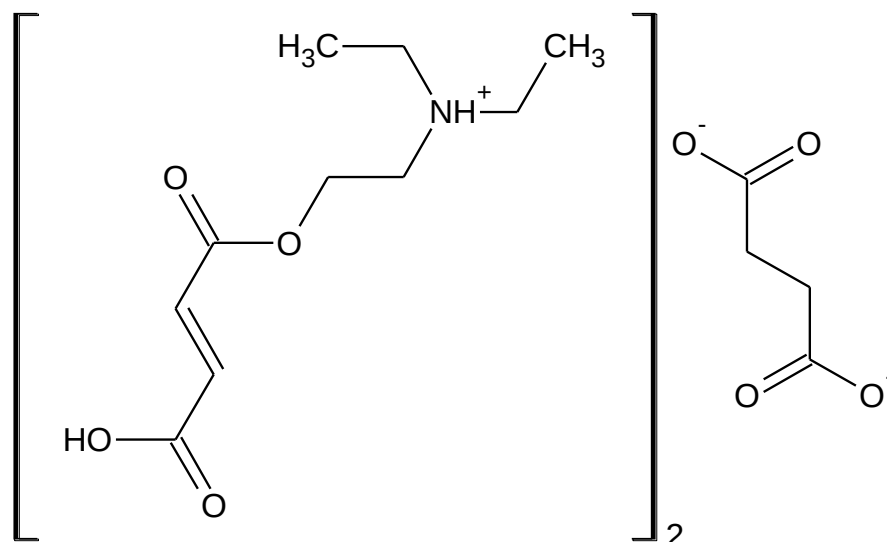


Рисунок 2– Химическая формула бис{2-[(2E)-4- гидроксн-4- оксобут-2- еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоат (2:1)

Соединение отличается высокая безопасность – величина полулетальной дозы (LD_{50}) при пероральном введении мышам обоего пола превышает 2000 мг/кг, что позволяет отнести тестируемое соединение к группе мало или умеренно токсичных веществ по различным классификациям.

Референсные препараты. 1,2,4-тиадиазол-3,5-диамин (амтизол) является одним из наиболее эффективных антигипоксантов. Амтизол рассматривается в качестве эталонного антигипоксанта [Лукьянова Л.Д., 1990]. Препарат вводили внутрнжелудочно за 40 минут до начала эксперимента в дозах 25 и 50 мг/кг [Александрова А.Е., 2005; Зарубина И.В., 1999].

Цитофлавин – сукцинатсодержащий антигипоксант. В его состав входят: янтарная кислота – важнейший субстрат цикла Кребса в дозе 300 мг; рибофлавин – обеспечивает протекание реакций, регулируемых флавиновыми коферментами в дозе 5 мг; рибоксин - ускоряет скорость анаэробного гликолиза, при этом является аденозиниметиком в дозе 50 мг; никотинамид – прекурсор коферментных дегидрогеназ $НАД^+$ и $НАДФ^+$ в дозе 25 мг. Препарат вводился внутрнжелудочно в дозах 10, 25, 50, 75, 130 и 600

мг/ кг (по сукцинату) за 20-40 минут до начала экспериментов [Афанасьев В.В., 2010].

Цитиколин – это комплекс из цитидина и холина, связанных дифосфатным мостиком. Является необходимым промежуточным звеном в синтезе фосфотидилхолина, основного мозгового фосфолипида, в пути синтеза фосфолипидов (путь Кеннеди).

При пероральном введении биодоступность цитиколина сопоставима с парентеральным введением, что обеспечивает полное прохождение препарата через гематоэнцефалический барьер, где препарат встраивается к нейрональные мембраны и фракцию микросомальных фосфолипидов. Вводили внутривенно в дозе 500 мг/кг [Clark W.M., 2001, Schabitz W.R., 1996].

Холина альфосцерат – лекарственное средство с центральным холиномиметическим действием. Механизм действия препарата основан на том, что при попадании в организм под действием ферментов происходит его расщепление на холин и глицерофосфат: холин участвует в биосинтезе ацетилхолина, а глицерофосфат является предшественником фосфолипидов (фосфатдихолина) мембраны нейронов. Кроме того, холина альфосцерат участвует в анаболических процессах, ответственных за мембранный фосфолипидный и глицеролипидный синтез [Одинак М.М. и соавт., 2009]. Холина альфосцерат вводился в дозе 100 мг/кг внутривенно [Amenta F. et al., 1993].

Пирацетам – эталонный ноотроп вводили внутривенно в дозе 900 мг/кг ежедневно в течение 14 дней. Пирацетам обладает 100% биодоступностью. Основной механизм действия препарата, как и многих других ноотропов, связан с изменением метаболических, биоэнергетических процессов в нервной клетке [Keil U. et al., 2006]. Пирацетам стимулирует биосинтез ацетилхолина, обратный захват холина в синаптической щели и увеличивает плотность М-холинорецепторов во фронтальной коре пожилых крыс [Pilch H. et al., 1988]. Пирацетам избирательно активирует АМРА

подтип глутаматных рецепторов, не влияя на другие их подтипы [Pedata F. et al., 1984]. Этот факт важен в связи с тем, что именно с активацией АМРА-рецепторов связывается формирование долговременной памяти.

Экспериментальные животные

Эксперименты проведены на 504 белых беспородных лабораторных мышках самцах массой 22-30 г и мышках самцах линии СВА массой 18-22 г, 196 белых крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 г. Все эксперименты выполняли в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказ Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», согласно утвержденному письменному протоколу. Животные были получены из питомника «Рапполово» (Ленинградская область), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде.

Животные опытной и контрольной групп были распределены по массе и возрасту условиям кормления и содержания. Каждая экспериментальная и контрольная группа включала от 8 до 16 животных.

Распределение животных по методам исследования представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение животных по методам исследования

№ п/п	Методы исследования	Число животных	
		Мыши	Крысы
1.	Острая гемическая гипоксия	104	
2.	Острая гистотоксическая гипоксия	104	
3.	Острая нормобарическая гипоксия	104	
4.	Длительная интермиттирующая нормобарическая гипоксия	160	
5.	Неполная глобальная хроническая ишемия мозга		96
6.	Тест «Условная реакция пассивного избегания болевого раздражения»		60
7.	Тест «Экстраполяционное избавление»		40
8.	Тест «Т-лабиринт»	32	
6.	ИТОГО:	504	196

Распределение по экспериментальным моделям объектов исследования и их дозы представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Объекты исследования и их дозы

Модель	Препарат	Доза, мг/кг	Лекарственная форма
Острая нормобарическая гипоксия	ФДЭС	10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800	ФС
	Цитофлавин	10, 25, 50, 75, 600	Таблетки
	Амтизол	25, 50	ФС
Острая гемическая гипоксия	ФДЭС	10, 25, 50, 75	ФС
	Цитофлавин	10, 25, 50, 75, 600	Таблетки
	Амтизол	25,50	ФС
Острая гистотоксическая гипоксия	ФДЭС	10, 25, 50, 75	ФС
	Цитофлавин	10, 25, 50, 75, 600	Таблетки
	Амтизол	25, 50	ФС
Длительная интермиттирующая нормобарическая гипоксия	ФДЭС	10, 75	ФС
	Цитофлавин	130	Таблетки
	Цитиколин	500	Сироп
	Холина альфосцерат	100	Капсулы
Перманентная перевязка двух общих сонных артерий	ФДЭС	10, 75	ФС
	Цитофлавин	130	Таблетки
	Цитиколин	500	Сироп
	Холина альфосцерат	100	Капсулы
Тест «УРПИ»	ФДЭС	10, 75	ФС
	Пирацетам	900	Таблетки

Продолжение таблицы 3

Модель	Препарат	Доза, мг/кг	Лекарственная форма
Тест «Экстраполяционное избавление»	ФДЭС	10, 75	ФС
	Пирацетам	900	Таблетки
Тест «Т-лабиринт»	ФДЭС	10, 75	ФС
	Пирацетам	900	Таблетки

Методы оценки антигипоксической активности

2.3.1 Моделирование кратковременной гипоксии

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

Для оценки антигипоксической активности лекарственных средств традиционно использовали два подхода: оценка влияния препарата на среднегрупповые показатели индивидуальной гипоксической устойчивости, а также сдвиг в популяционной структуре устойчивости (изменение долей низко- средне- и высокоустойчивых животных) [Лукьянова Л.Д., 1992]. Как правило, первый подход используется для оценки однократного применения препарата, второй – курсового применения лекарственных средств.

В стандартных исследованиях антигипоксическая активность анализируемой субстанции может выражаться в относительных единицах (по отношению к контролю, в безразмерном варианте или в процентном исчислении) на основе среднегрупповых значений (например, высотного порога, времени жизни):

$$KA = X_{\text{пр}} / X_{\text{к}}, \quad (1)$$

где КА – коэффициент активности;

$X_{\text{пр}}$ – значение анализируемого показателя устойчивости при приеме препарата;

$X_{\text{к}}$ – в контрольной группе.

Такой подход, как правило, применяется при оценке антигипоксической активности по прямым показаниям (высотный порог, критический уровень концентрации кислорода, время жизни).

При использовании для оценки антигипоксической активности косвенных или второстепенных по значимости показателей использовался Индекс защиты (ИЗ), показывающий, какую часть негативных изменений показателей, вызванных внешним воздействием (в данном случае – ДИНГ) компенсирует применение данного препарата [Каркищенко Н.Н., 2017].

$$ИЗ = (X_{\text{пр}} - X_{\text{пл}}) / X_{\text{пл}}, \quad (2)$$

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

При исследовании антигипоксической активности лекарственных средств в случае высокой антигипоксической активности должно отмечаться повышение высотного порога и увеличение доли высокоустойчивых животных при снижении доли низко устойчивых. При умеренной антигипоксической активности могут или умеренно повышаться среднегрупповые значения высотного порога, или незначительно меняться соотношения между подгруппами животных по уровню устойчивости к гипоксии.

В сравнительных исследованиях с использованием референсных (эталонных) препаратов антигипоксическая активность исследуемого соединения оценивается в «эталонных» единицах [Каркищенко Н.Н., 2017] по следующей формуле:

$$AA = (X_{\text{пр}} - X_{\text{пл}}) / (X_{\text{э}} - X_{\text{пл}}), \quad (3)$$

где ААэ – антигипоксическая активность в «эталонных» единицах;

Х – показатель переносимости гипоксической пробы (например, высотный порог, время жизни, эмбриональная летальность, уровень лактата и т.д.);

Хпр - при приеме исследуемого препарата;

Хпл - при приеме плацебо, Хэ - при приеме «эталонного» препарата в стандартной дозе.

Кроме того, можно определить Коэффициент сравнительной эффективности (Ксэ):

$$Ксэ = X_{пр} / X_{э},$$

где Хпр – значение анализируемого показателя в условиях гипоксии при приеме препарата;

Хэ – при приеме эталонного препарата.

2.3.1.1 Острая нормобарическая гипоксия (ОНГ)

Исследования проводили в гипоксикамере «БИО-НОВА-204» (ООО «НТО Био-Нова», Россия) (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Установка «БИО-НОВА-204»

Принцип работы барокамеры основан на том, что окружающий воздух, очищенный фильтром, сжимается компрессором и подается на вход мембранного модуля. Полупроницаемые мембраны обладают свойством селективного пропускания молекул кислорода и азота воздуха. На выходе мембранного модуля получается воздух с уменьшенным содержанием кислорода. С выхода газоразделительного блока газ поступает по шлангу в камеру (объемом 75 литров). Установка обеспечивает плавную регулировку концентрации кислорода от 2 до 10% в гипоксической газовой смеси (ГГС). Производительность ГГС - не менее 5 л/мин. Процентное содержание кислорода в ГГС, подаваемой животным, устанавливалась и регулировалась с помощью газоанализатора, который встроен в установку. В гипоксическую камеру помещали до 45 мышей одновременно контрольной и опытной групп. Для каждого животного регистрировали критический процент кислорода в ГГС, который вызывал его гибель.

Стандартизированная динамика формирования нормобарической гипоксии в гипоксикамере "БИО-НОВА-204" представлена на Рисунке 4.

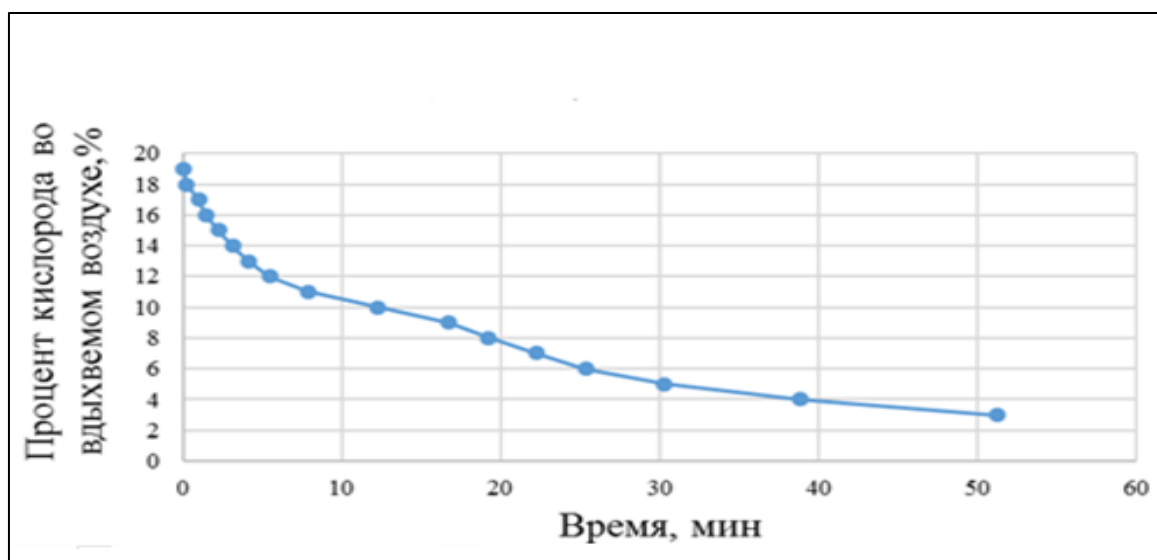


Рисунок 4 – Динамика содержания кислорода во вдыхаемом воздухе при моделировании ОНГ

В ходе предварительно проведенных исследований было установлено, что гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% до 3,4% [Титович И.А., 2016].

Анализ данных, представленных на рисунке 5, показывает, что в контрольной группе кривая распределения достаточно далека от вида кривой нормального распределения, имея частотный «завал» в области более высоких значений содержания кислорода, что соответствует более низкой устойчивости к гипоксии (Рисунок 5). Анализ кривой по точкам перегиба позволяет определить границы диапазонов устойчивости: для высокоустойчивых животных гибель животных происходит при диапазоне содержания кислорода в ГГС 3,7% и менее, диапазону средней устойчивости соответствует содержание кислорода в ГГС от 3,8 до 4,6 %, а диапазону низкой устойчивости к гипоксии – содержание кислорода в ГГС – 4,9% и более. В контрольной группе животных высокоустойчивых животных было в среднем 13%, среднеустойчивых – 67%, и низкоустойчивых – 20%.

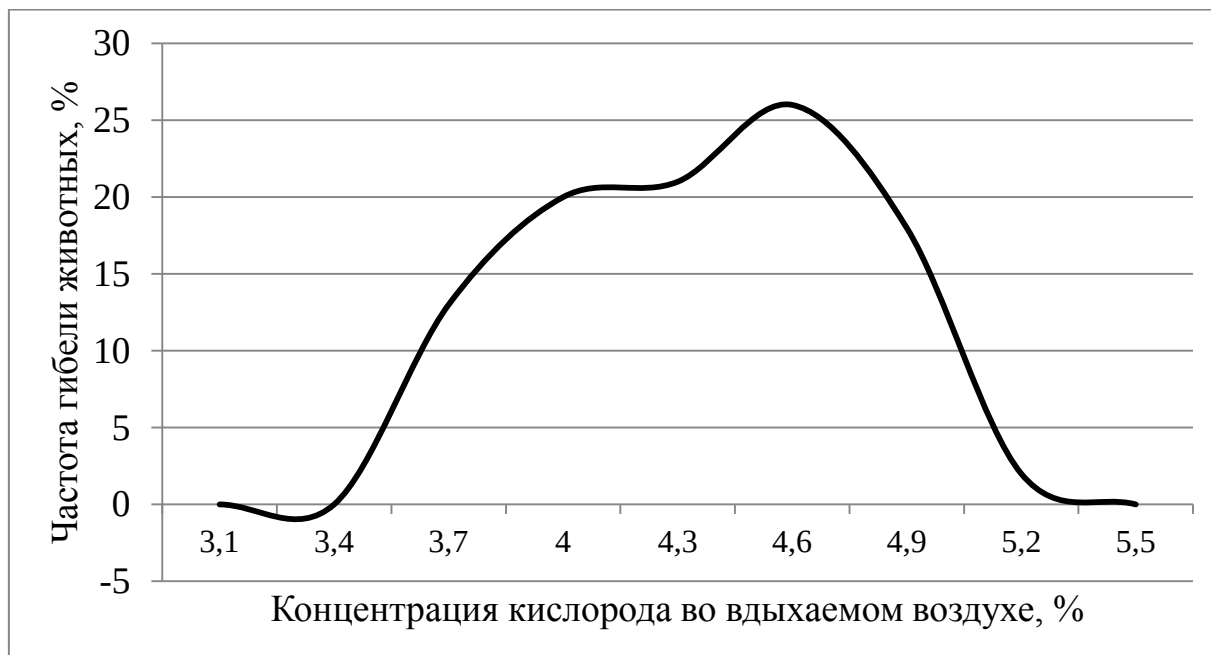


Рисунок 5 – Частотная кривая распределения гибели животных в зависимости от содержания кислорода в ГГС в контрольной группе

Данные, характеризующие распределение гибели животных, используются для обоснования различных режимов нормобарического гипоксического воздействия, в частности – для хронического гипоксического воздействия.

2.3.1.2 Острая гемическая гипоксия (ОГемГ)

Для создания модели острой гемической гипоксии животным вводили внутривентрально натрия нитрит (300 мг/кг), предварительно растворимый в воде очищенной. Препараты вводили внутривентрально однократно за 40 минут до начала экспериментов. Животные контрольной группы получали 0,9% физиологический раствор в эквивалентных количествах. Учитывали продолжительность жизни мышей в минутах [Лукьянова Л.Д., 1990].

2.3.1.3 Острая гистотоксическая гипоксия (ОГтГ)

Острую гистотоксическую гипоксию моделировали, путем внутривентрального введения мышам 0,4% водного раствора натрия нитропруссида (20 мг/кг). Препараты вводили внутривентрально однократно за 40 минут до начала экспериментов. Животные контрольной группы получали 0,9% физиологический раствор в эквивалентных количествах. Регистрировали продолжительность жизни животных после введения ингибитора тканевого дыхания [Лукьянова Л.Д., 1990].

2.3.2 Модель длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии (ДИНГ)

Длительную интермиттирующую нормобарическую гипоксию моделировали в гипоксикамере "БИО-НОВА-204" (ООО «НТО Био-Нова», Россия), описание работы которой представлено в пункте 2.3.1. В гипоксикамеру подавалась ГГС, содержащая 6% кислорода. Животных помещали в камеру ежедневно на 6 часов, в течение 2-х недель. Интактным контролем служили животные, помещаемые в рабочую гипоксикамеру без ее герметизации и создания гипоксии («холостой прогон», позволяющий снизить значимость стрессового фактора на животных).

Как известно, увеличение продолжительности воздействия гипоксии или резкое повышение силы этого воздействия, зависящее от степени снижения давления O_2 во вдыхаемом воздухе, неизбежно приводит к различным функциональным расстройствам и развитию стойкой патологии. Гипоксия средней тяжести (12-9% кислорода во вдыхаемом воздухе) вызывает приспособления, которые защищают мозг от повреждений. В то время как тяжелая гипоксия ($O_2 \leq 8$) приводит к выраженному окислительному стрессу, происходит подавление срочной и отсроченной экспрессии HIF-1 α и снижение способности к индукции SUCNR1. [Кирова Ю.И., 2016] Длительная интермиттирующая нормобарическая гипоксия позволяет сформировать у лабораторных животных состояние хронического гипоксического стресса.

Препараты вводили перорально однократно за 10 минут до начала экспериментов. Животные контрольной группы получали 0,9% раствор NaCl в эквивалентных количествах.

Модель перманентной перевязки общих сонных артерий

Церебральную ишемию моделировали двусторонней перевязкой левой и правой общих сонных артерий. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (350 мг/кг, Sigma, США). Посредством хирургического доступа выделяли общие сонные артерии, подводили под них полипропиленовые лигатуры и перевязывали. У ложнооперированных крыс, выполняли те же манипуляции, кроме перевязки общих сонных артерий. Препараты вводили внутривенно однократно за 40 минут до начала экспериментов. Животные контрольной и ложнооперированной групп получали 0,9% NaCl раствор в эквивалентных количествах. В течение 21 дня оценивали выживаемость животных, а также по окончании эксперимента ориентировочно-исследовательское поведение в тесте «Открытое поле» и нарушение в координации движений в тесте «Ротарод».

Методы оценки поведения, координации и когнитивных функций животных

2.5.1 Тест «Открытое поле» (ОП)

Оценку ориентировочно-исследовательского поведения осуществляли у всех экспериментальных животных до и после проведения длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии или перевязки общих сонных артерий в тесте «Открытого поле» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия). Для этого каждое животное по одному помещали в центр поля и включали секундомер. Фиксировали количество пересечений, стоек, заглядываний в норки, дефекаций, уринаций и груминг в течение 3-х минут. По истечении этого времени проверяли реакцию на хлопок и захват,

результат выражали в баллах. Оценивали общую двигательную активность (ОДА) – определяли как сумму количества пересечений границ квадратов в периферической и в центральной частях арены за 3 минуты; поисково-исследовательскую активность (ПИА) определяли как сумму вертикальных перемещений и заглядываний; эмоциональную лабильность (ЭЛ) – как сумму дефекаций (Д) и уринаций (У); агрессивность (Аг) как сумму баллов за реакцию на хлопок и захват; груминг как показатель комфортности состояния животного [Martin-Arenas F.J., 2014].

2.5.2 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

Методика предназначена для изучения поведения грызунов в условиях стрессогенности и позволяет оценить: уровень тревожности животного (по предпочтению темноты/света, боязни высоты, выраженности и динамике поведения «выглядывания»), симптомы неврологического дефицита, привыкание [Walf A.A. et al., 2007].

В тесте ПКЛ животное помещали на центральную площадку и включали секундомер. Длительность эксперимента составила 3 минуты. В течение эксперимента фиксировали время нахождения в открытом (ВНОР) и закрытом рукавах (ВНЗР), время нахождения на центральной площадке (ВНЦП), латентный период первого захода в открытый рукав (ЛППЗОР), количество заходов в открытый (КЗОР) и закрытый рукава (КЗЗР), количество стоек (КС), количество выглядываний из рукавов (КВР), дефекацию (Д) и уринацию (У). Эмоциональную лабильность рассчитывали, как сумму Д и У, ориентировочную активность как сумму КС, КВР, КЗОР, КЗЗ [Walf A.A. et al., 2007].

Время, проведенное животным в центральном и в боковых отсеках лабиринта, отражает уровень двигательной активности животного, а также характеризуют интенсивность обследования ими новой среды, и может

использоваться для оценки стимулирующего или седативного эффекта веществ.

О состоянии тревожности у животных судили по времени нахождения в закрытом рукаве, латентному периоду первого захода в открытый рукав, количеству заходов в открытый и закрытый рукава, а также по количеству дефекаций и уринаций, наличию конфликта мотиваций – по времени нахождения на центральной площадке.

2.5.3 Тест «Ротарод»

Для определения степени неврологического дефицита, выражающегося в нарушении координации движений, крыс помещали в аппаратно-программный комплекс «Ротарод» (АПК - «Ротарод») (ООО «Нейроботикс», Россия) с постепенно увеличивающейся скоростью вращения стержня от 4 до 30 об/мин в течение 5 минут. Регистрировалось время удержания на вращающемся стержне (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Аппаратно-программный комплекс «Ротарод»

2.5.4 Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)

Данный метод оценки когнитивных функций основан на выработке условной реакции пассивного избегания в челночной камере у крыс в ответ на безусловный электрокожный болевой раздражитель, предъявляемый в предпочитаемом грызунами тёмном отсеке камеры. Обучение животных проводилось в двухкамерной установке PACS-30 (Columbus Instruments, США), состоящей из затемненного и освещённого отсеков, соединенных дверцей. Использовался ток силой 1 мА, который предъявлялся в течение 3-х секунд однократно.

Эксперимент состоял из 3-х стадий:

1) Оценка «норкового» рефлекса. Крысу помещали в светлый отсек (хвостом к дверце). Вследствие своих биологических особенностей (врождённое предпочтение тёмных участков пространства у грызунов) крыса предпочитала находиться в тёмном помещении. В эксперимент отбирали животных с наличием норкового рефлекса.

2) Обучение. При переходе в тёмный отсек животное получало болевое электрокожное раздражение через электродный пол. За 30 минут до обучения животным внутрибрюшинно вводили скополамина гидробромид (Sigma, США) в дозе 1,5 мг/кг.

3) Воспроизведение. Через 2 часа и 24 часа после обучения крысу помещали в светлый отсек. В течение 2-х минут регистрировали количество обученных крыс (не зашедших в тёмную камеру на протяжении 2 минут через 2 и 24 часа после обучения), время нахождения животных в тёмной и светлой камерах через 2 и 24 часа после обучения [Воронина Т.А., 1989].

Препараты вводили ежедневно внутривентрикулярно в течение 14 дней до введения скополамина. Животные контрольной и интактной групп получали изотонический раствор натрия хлорида в эквивалентных количествах.

2.5.5 Тест «Экстраполяционное избавление» (ЭПИ)

В тесте ««Экстраполяционное избавление» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия) (Рисунок 7) крысу, взятую правой рукой полным хватом за плечевой пояс и шею, аккуратно помещали в воду, опустив ее внутрь прозрачного цилиндра хвостом вниз. Регистрировали латентный период начала движений после посадки в установку, латентный период подныривания. Время тестирования составляло не более 2-х минут [Бондаренко Н.А., 1990].



Рисунок 7 – Установка «Экстраполяционное избавление»

Препараты вводили ежедневно внутрижелудочно в течение 14 дней после первого обучения. Животные контрольной группы получали изотонический раствор натрия хлорида в эквивалентных количествах.

2.5.6 Тест «Т-лабиринт»

Для проведения теста животных помещали в Т-лабиринт (НПК Открытая Наука, Москва, Россия) (Рисунок 8), где в конце обоих рукавов находилось вознаграждение в виде корма.



Рисунок 8 – Установка «Т-Лабиринт»

Животному давалось время выбрать рукав и съесть корм. Выбранный рукав впоследствии обозначался как «неправильный» и закрывался перегородкой на время обучения. В следующие 5 дней происходило обучение животных, в ходе которого ежедневно в серии из 10 попыток животное могло пройти в «правильный» рукав, где находилось вознаграждение. Тесты по оценке памяти проводились на 1-й, 5-й и 10-й день после окончания обучения. Фиксировалось количество посещений «правильного» и «неправильного» рукава в серии из 10 попыток. Критерием оценки обучаемости было осуществление более 8 заходов в правильный рукав [Deacon R.M.J., 2006].

Препараты вводили ежедневно внутривентрально в течение 5 дней во время обучения в Т-лабиринте, далее введение препаратов прекращалось. Животные контрольной группы получали изотонический раствор натрия хлорида в эквивалентных количествах.

Биохимические методы исследования

2.6.1 Биохимические методы исследования крови

С помощью портативного глюкометра «Accu-ChekActive» (RocheDiagnostics, Германия) в крови определяли содержание глюкозы (ммоль/л) сразу после гипоксического воздействия. Для этого каплю крови из хвостовой вены животного наносили на ланцет, который помещался в анализатор.

С помощью портативного биохимического анализатора Accutrend Plus (Roche Diagnostics, Германия) в крови определяли содержание лактата (ммоль/л) сразу после гипоксического воздействия. Для этого каплю крови из хвостовой вены животного наносили на ланцет, который помещался в анализатор.

2.6.2 Биохимические методы исследования ткани мозга

2.6.2.1 Получение образцов ткани

После проведения ДИНГ мышей наркотизировали хлоралгидратом 350 мг/кг, далее животных декапитировали, быстро извлекали головной мозг, который промывали охлаждённым физиологическим раствором, обсушивали фильтровальной бумагой и удаляли мягкую мозговую оболочку с кровеносными сосудами. Головной мозг взвешивали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в течение 30 секунд на льду. Для гомогенизации использовали среду охлажденной 0,25 М сахарозы на 0,9% растворе NaCl, соотношение массы ткани и объема раствора

сахарозы гомогената составляло 1 г: 9 мл. Для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер гомогенат ткани центрифугировали 10 минут при 1500 g (температура +4 °C). Супернатант переносили в пробирки типа «эппендорф» и далее центрифугировали 15 минут на 12000 g в центрифуге Sigma 2-16PK (Sigma Laborzentrifugen, Германия). Далее полученный супернатант использовали для определения глутатионпероксидазы и каталазы.

2.6.2.2 Определение активности глутатионпероксидазы

Ферментативную активность глутатионпероксидазы определяли по следующей методике. Реакционная смесь 1: реактив А - 0,636 мМ раствор восстановленного глутатиона (GSH) в трис-HCl-буфере с азидом натрия: 150 мкл водного раствора азидата натрия (26 мг/мл) смешивали с 5250 мкл 0,1 М трис-HCl-буфера (pH=8,5), и с 27 мкл водного раствора GSH (51,1 мг/мл); реактив В - 5 мМ водного раствора H_2O_2 : готовится разведением в 4 раза 20 мМ раствора, имеющего поглощение при 240 нм, равное 0,872. Итоговые концентрации GSH и пероксида до остановки реакции трихлоруксусной кислотой (ТХУ) при этом составляют 0,55 и 0,192 мМ, соответственно. Биоматериал - супернатант головного мозга мыши, предварительно разведенный 0,25 М раствором сахарозы в 2 раза.

Реактив А (280 мкл) преинкубировался в течение нескольких минут при 37 °C, затем вносилось 120 мкл биоматериала (либо раствора, используемого для разбавления супернатанта – для оценки неферментативного окисления (НФО) глутатиона пероксидом водорода). Одновременно с биоматериалом (предварительно не смешивая с ним) вносили 16 мкл реактива В и инкубировали ровно 75 с, останавливали реакцию добавлением 80 мкл 30% ТХУ (w/v).

Для учета возможных изменений концентрации GSH, вызванных биоматериалом, также готовили пробу, в которую реактив В вносили одновременно с ТХУ, а не с биоматериалом, также предварительно не смешивая (аналогично готовили пробу, в которой биоматериал заменен на его растворитель (стандартная проба); при отсутствии влияния биоматериала на начальную концентрацию GSH результаты определения в двух пробах совпадут). После остановки реакции пробы центрифугировали при комнатной температуре 15°C 10 мин при 1000 g.

Реакционная смесь II: в спектрофотометрическую кювету объемом 1 мл и длиной оптического пути 1 см вносят 135 мкл супернатанта, содержащего GSH, добавляли 920 мкл 0,1 М трис-HCl-буфера (pH 8.5) и 7,5 мкл раствора 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ) (4 мг/мл абсолютного метанола). Регистрировали наступление максимума поглощения при 412 нм через 2-3 минуты от момента внесения ДТНБ. В данном случае 1 единица оптической плотности (1.000) реакционной смеси II соответствовала концентрации GSH 0,663 мМ в реакционной смеси I (концентрация GSH рассчитывалась по коэффициенту молярного поглощения продукта реакции взаимодействия GSH с ДТНБ (2-нитро-5-тиобензоата) при длине волны 412 нм, равного $14150 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, с пересчетом на разведения; мольное соотношение между 2-нитро-5-тиобензоатом и GSH – 1:1).

Убыль GSH (мкМ/мин) в ферментативной реакции оценивали по разнице в содержании GSH между пробой для НФО и опытной пробой (содержащей биоматериал). Убыль GSH в НФО оценивали по разнице между содержанием GSH в стандартной пробе и в пробе для НФО [Разыграев А.В., 2016].

2.6.2.3 Определение активности каталазы

Активность каталазы определяли модифицированным методом, описанным в работе [Beers R.F., 1952]. Принцип метода основан на ферментативном разложении каталазой перекиси водорода, о скорости процесса судят по снижению экстинкции проб на длине волны 270 нм. Для осуществления реакции *ex tempore* из фармакопейного препарата «Пергидроль» готовили 0,3 % раствор H_2O_2 на 0,1 М калий-фосфатном буфере с $\text{pH} = 7,8$. Ферментативную реакцию проводили при комнатной температуре. К 2,3 мл 0,3 % раствора перекиси добавляли 300 мкл супернатанта. В контрольную пробу к 2,3 мл 0,3% раствора перекиси добавляли 300 мкл раствора сахарозы. Полученный раствор имел экстинцию $E=0,655$ на длине волны 270 нм против дистиллированной воды в кювете с длиной оптического пути 10 мм (72,8 мМ H_2O_2 по нашим расчетам). Пробу с супернатантом гомогената мозга фотометрировали на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США) против контрольной пробы на длине волны 270 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм, регистрируя снижение экстинкции в течение первых 210 с от внесения супернатанта гомогената. Удельную каталазную активность выражали в нмолях израсходованной перекиси водорода в секунду на 1 мг белка.

2.6.2.4 Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли турбидиметрическим методом [Chesnokova L.S., 1997] в нашей модификации. Он основан на помутнении белкового раствора при добавлении к нему трихлоруксусной кислоты.

Из раствора стандартного белка фирмы Сорма (Польша) в концентрации 80 г/л готовили стандартные растворы, содержащие 2 и 4 мг

белка/мл. Для приготовления раствора, содержащего 4 мг/мл белка, к 10 мкл исходного раствора добавляли 190 мкл дистиллированной воды. Для приготовления раствора, содержащего 2 мг/мл, белок брали из раствора, содержащего 4 мг/мл белка 50 мкл и добавляли такой же объем дистиллированной воды.

Проба для референсной кюветы состояла из 970 мкл дистиллированной воды и 30 мкл 0,25 М сахарозы. Стандартные пробы, содержали 960 мкл дистиллированной воды, 30 мкл 0,25 М сахарозы и 10 мкл раствора, содержащего 2 и 4 мг/мл белка. Опытные пробы состояли 970 мкл воды и 30 мкл супернатанта гомогената. Вся реакционная смесь перемешивалась, после чего добавляли 1 мл 30% трихлоруксусной кислоты. Через 40 минут измеряли поглощение, вызванное помутнением, при длине волны 340 нм против пробы в референсной кювете на Lambda 25 (Perkin Elmer, США).

Гематологические исследования

Взятие крови производили из ретроорбитального синуса у мышей 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) $\pm$ ошибка среднего(m). Уровень доверительной вероятности был задан равным ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ФДЭС на переносимость мышами острой гипоксии

Изучение антигипоксической активности проводили в диапазоне доз от 10 до 800 мг/кг. В качестве референсных препаратов были выбраны амтизол (в дозах 25 и 50 мг/кг) и цитофлавин (в дозах 10-75 мг/кг и субстратной дозе 600 мг/кг). Выбор доз для референсных препаратов осуществлен исходя из литературных данных. В контрольной группе было по 16 животных, в опытных по 8 особей.

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

Таблица 4 – Влияние исследуемых препаратов на переносимость мышами острой нормобарической гипоксии

Группа животных	Доза, мг/кг	Содержание кислорода во вдыхаемом воздухе, при котором наступала гибель животных, (%)
Контроль	-	$4,2 \pm 0,2$
Цитофлавин	10	$4,6 \pm 0,1^1$
	25	$4,5 \pm 0,1^1$
	50	$4,1 \pm 0,1$
	75	$4,8 \pm 0,1^1$
	600	$4,1 \pm 0,2^2$
Амтизол	25	$3,6 \pm 0,1^{1,2}$
	50	$3,4 \pm 0,1^{1,3}$

Продолжение таблицы 4

Группа животных	Доза, мг/кг	Содержание кислорода во вдыхаемом воздухе, при котором наступала гибель животных, %
ФДЭС	10	$3,7 \pm 0,1^{1,2}$
	25	$3,9 \pm 0,1^2$
ФДЭС	50	$4,0 \pm 0,1$
	75	$3,6 \pm 0,1^{1,2,3}$
	100	$3,9 \pm 0,3$
	200	$3,9 \pm 0,5$
	300	$3,7 \pm 0,6^{1,2}$
	400	$4,1 \pm 0,7^2$
	500	$4,4 \pm 0,6^2$
	600	$3,7 \pm 0,5^{1,2}$
	700	$3,9 \pm 0,7^2$
	800	$3,7 \pm 0,6^{1,2}$
Примечание – 1 – достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$), 2 – достоверное отличие от группы амтизола (50 мг/кг) ($p < 0,05$), 3 – достоверное отличие от группы цитофлавина (600 мг/кг) ($p < 0,05$)		

Цитофлавин не оказывал антигипоксического эффекта на модели ОНГ. Амтизол в дозе 50 мг/кг превосходил контрольную группу в 1,25 раза ($p < 0,05$).

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. Животные

погибали при концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе в среднем в 1,15 раза ниже, чем в контроле.

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 амтизола (25 мг/кг).

Так как из референсных препаратов статистически достоверная антигипоксическая активность была обнаружена у амтизола в минимальной дозе 25 мг/кг, то антигипоксическая активность ФДЭС оценивалась в «амтизоловых» единицах для этой дозы референсного препарата [Каркищенко Н.Н., 2017].

Анализ рисунка 9 показывает, что препарат ФДЭС в широком диапазоне доз (от 10 до 800 мг/кг) проявляет антигипоксическую активность, сопоставимую с активностью референсного препарата амтизола в дозе 25 мг/кг (Рисунок 9). В усредненном варианте по всему диапазону доз уровень антигипоксической активности препарата равен 0,94 амтизоловых единиц. Максимальная активность (0,97-1,0) была характерна для доз 10, 75, 300, 600 и 800 мг, а минимальная (0,83 амтизоловые единицы) – для дозы 500 мг/кг.

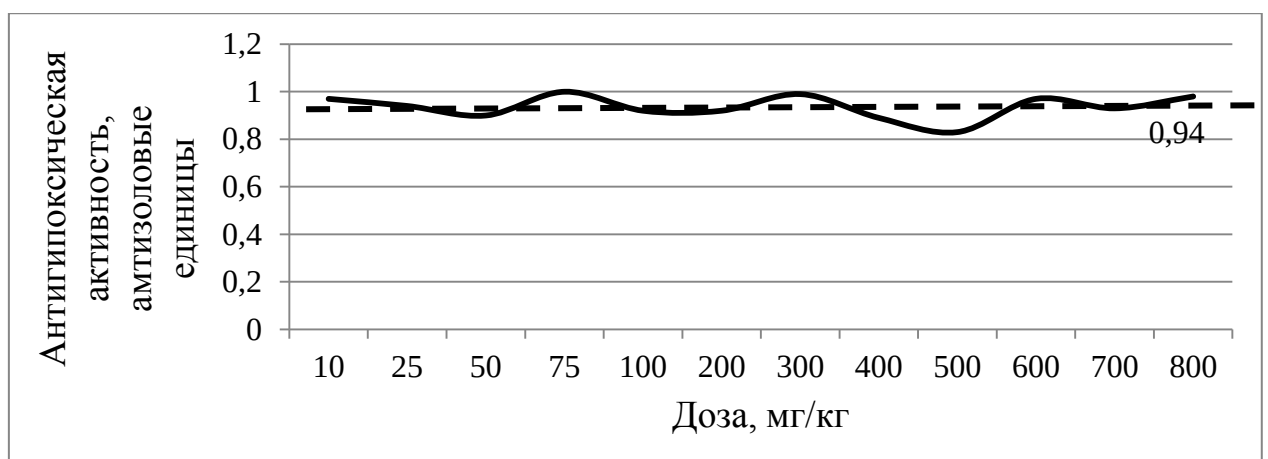


Рисунок 9 – Кривая «Доза-Эффект» для ФДЭС на модели оценки антигипоксической активности при воздействии острой нормобарической гипоксии (амтизоловые единицы)

Важной чертой антигипоксического действия препарата является отсутствие зависимости эффекта от дозы препарата, что позволяет исключить субстратный механизм его действия.

Подобная «плоская» кривая доза-эффект является типичной для лекарственных средств с рецепторным механизмом действия, при высоком сродстве лиганда к рецептору и малом количестве рецептора, когда даже при относительно низкой дозе препарата все молекулы рецептора являются оккупированными своими лигандами [Altshuler B., 1981].

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.

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.

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

Цитофлавин на модели острой гемической гипоксии не оказывал достоверного антигипоксического эффекта (Таблица 5). 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.

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» аналогично описанному в разделе 3.1.1.

Таблица 5 – Влияние исследуемых препаратов на продолжительность жизни мышей на модели острой гемической гипоксии

Группа животных	Доза, мг/кг	Время жизни, мин
Контроль	-	$15,5 \pm 2,0$
Цитофлавин	10	$13,7 \pm 0,6^{2,3}$
	25	$14,6 \pm 0,6^{2,3}$
	50	$14,3 \pm 1,2^{2,3}$
	75	$17,5 \pm 1,2^2$
	600	$15,6 \pm 4,2^2$
Амтизол	25	$16,9 \pm 1,7^2$
	50	$23,0 \pm 1,5^{1,3}$
ФДЭС	10	$15,1 \pm 1,7^2$
	25	$16,9 \pm 2,2^2$
	50	$20,0 \pm 3,0^3$
	75	$27,3 \pm 3,3^{1,2,3}$
Примечание – 1 – достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$), 2-достоверное отличие от группы амтизола (50 мг/кг) ($p < 0,05$), 3 – достоверное отличие от группы цитофлавина (75 мг/кг) ($p < 0,05$)		

Анализ рисунка 10 показывает, что на модели гемической гипоксии антигипоксическая активность ФДЭС имеет прямой дозозависимый эффект (в отличие от модели острой нормобарической гипоксии).

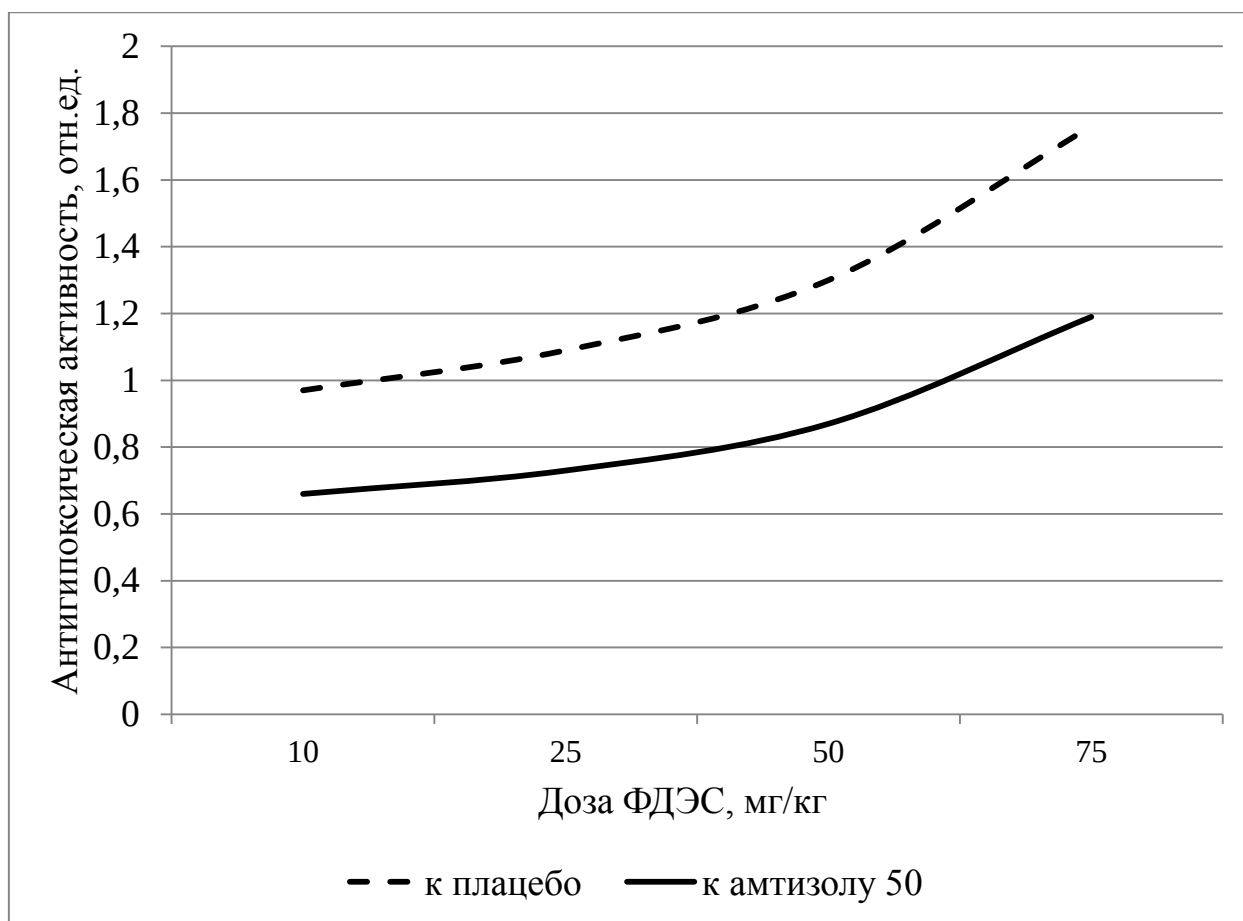


Рисунок 10 – Кривая «Доза-эффект» для антигипоксической активности ФДЭС на модели гемической гипоксии

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. Не исключен также вклад в антигипоксический эффект регулирующее действие янтарной кислоты на кислородтранспортную функцию гемоглобина [Ивницкий Ю. Ю., 1998]. Наибольшую антигипоксическую активность на модели острой гемической гипоксии проявил ФДЭС в дозе 75 мг/кг.

На модели острой гистотоксической гипоксии (ОГтГ) установлено, что после введения ингибитора тканевого дыхания - натрия нитропруссид (20

мг/кг) продолжительность жизни в контрольной группе составила $9,74 \pm 1,59$ минут (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние исследуемых препаратов на продолжительность жизни мышей на модели острой гистотоксической гипоксии

Группа животных	Доза, мг/кг	Время жизни, мин
Контроль	-	$9,7 \pm 1,6$
Цитофлавин	10	$8,4 \pm 0,2^{2,3}$
	25	$10,3 \pm 0,8^{2,3}$
	50	$7,3 \pm 0,7^{1,2,3}$
	75	$10,4 \pm 1,0^{2,3}$
	600	$20,7 \pm 6,4^1$
Амтизол	25	$15,1 \pm 1,6^1$
	50	$16,8 \pm 0,7^1$
ФДЭС	10	$14,6 \pm 1,2^1$
	25	$14,1 \pm 2,1^1$
	50	$17,8 \pm 2,0^1$
	75	$17,0 \pm 3,1^1$
Примечание – 1 – достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$); 2-достоверное отличие от группы амтизола (50 мг/кг) ($p < 0,05$); 3 – достоверное отличие от группы цитофлавина (600 мг/кг) ($p < 0,05$)		

Амтизол в обеих исследованных дозах проявлял антигипоксическое действие на модели гистотоксической гипоксии (+55% и +73% к эффекту плацебо соответственно, $p < 0,05$). Так как достоверный антигипоксический эффект выявлен при применении более низкой дозы референсного препарата, для оценки сравнительной эффективности ФДЭС была использована именно она.

Представленные на рисунке 11 данные показывают, что на модели гистотоксической гипоксии ФДЭС проявляет умеренную дозозависимость, однако она явно непропорциональна росту дозы: при увеличении дозы препарата в 5 раз антигипоксическая активность повысилась по отношению к плацебо только на 30%, причем этот прирост не является статистически достоверным (Рисунок 11).

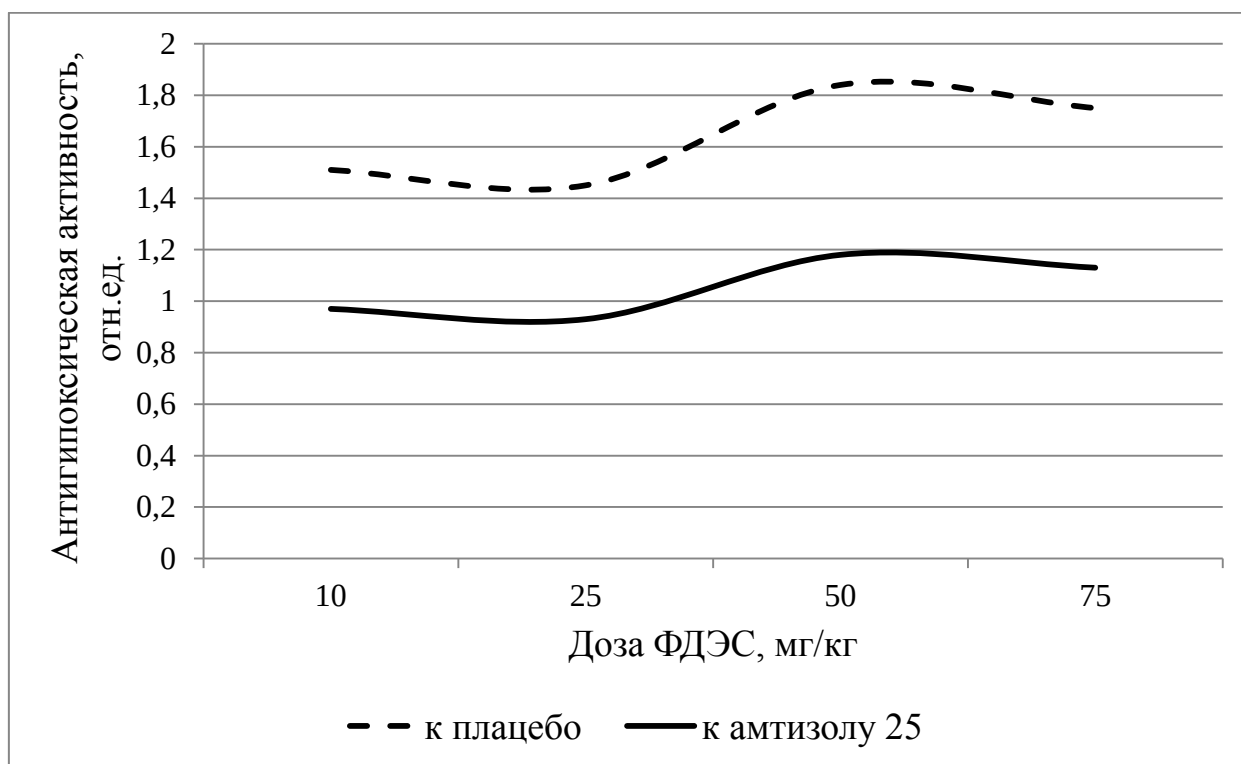


Рисунок 11 – Кривая «Доза-эффект» для антигипоксической активности ФДЭС на модели гистотоксической гипоксии

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 свидетельствует и о схожести молекулярных механизмов антигипоксического действия при воздействии соответствующих видов гипоксии.

Можно предположить, что увеличение антигипоксической активности более высоких доз ФДЭС связано с субстратными дозами янтарной кислоты,

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

Полученные данные по фармакологической активности цитофлавина на различных моделях гипоксии подтвердили результаты ранее проведенных исследований по изучению антигипоксической активности препарата. Так, внутрибрюшинное введение цитофлавина мышам в дозе 1 мл/кг показало его антигипоксическое действие только в баро- и гермокамере у мышей, в то время как на моделях острой гемической и гистотоксической гипоксии оно было незначительным [Яснецов В.В., 2012]. Очевидно, на этих наиболее «жестких» моделях гипоксии, действие сукцината, как интермедиата цикла трикарбоновых кислот, не успевает развиться из-за подавления и ФАД-зависимых ферментов в условиях очень жесткого дефицита кислорода или блокады электрон-транспортной цепи [Лукьянова Л.Д., 2011].

Амтизол активно проникает в митохондрии, уменьшает угнетение дегидрогеназ цикла Кребса, предотвращает разобщение окисления и фосфорилирования, увеличивает продукцию АТФ. Кроме того, препарат снижает кислородный запрос тканей за счет ингибирования микросомального и свободнорадикального окисления и увеличивает использование кислорода в энергопродуцирующих окислительных реакциях в митохондриях [Зарубина И.В., 1999]. Он активирует гликолиз с увеличением анаэробного образования АТФ, уменьшает образование лактата и увеличивает его утилизацию в реакциях глюконеогенеза, обеспечивает ресинтез углеводов, ослабляя проявления метаболического ацидоза [Зарубина И.В., 1999].

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 и транс-этилен-1,2-дикарбоновая кислоты реализуют 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 соответственно в цикле Кребса и увеличению образования АТФ в клетках.

Однако в условиях «жесткой» гипоксии дефицит кислорода, лимитирующий скорость окисления всех субстратов, снижает ценность сукцината [Кондрашова М.Н., 1996; 2000]. В этих условиях инверсивные превращения фумарата выполняют роль триггера, который, в зависимости от концентрации кислорода регулирует течение конечных реакций цикла Кребса в прямом «сукцинат-фумарат-малат» либо в обратном «малат-фумарат-сукцинат» направлениях, и сопровождаются синтезом АТФ [Хочачка П., 1988] При дефиците кислорода фумарат, восстанавливаясь ФАД·Н₂-группой сукцинатдегидрогеназой, превращается в сукцинат и освобождает новые порции окисленной формы ФАД. Принимая восстановительные эквиваленты от НАД-Н, ФАД способствует снятию гипервосстановленности НАД-звена дыхательной цепи и синтезу АТФ в бескислородной среде. К тому же, образование в этих реакциях окисленной формы НАД запускает также и механизм гликолитической продукции АТФ [Слепнева Л.В., 2013].

В реализации антигипоксической активности нового соединения аминоксанола существенную и достоверную роль могут играть как анионная часть (кислотный остаток), так и эфирное производное аминоксанола и дикарбоновой кислоты, что было показано ранее для соединений сходной структуры [Шустов Е.Б. и др. 2015].

Фармакологическая активность ФДЭС в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии

В данной серии экспериментов исследовали влияние ФДЭС после воздействия длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии на поведение животных, уровень глюкозы и лактата, показатели гемограммы, активность глутатионпероксидазы и каталазы в супернатанте головного мозга.

ФДЭС исследовали в дозах 10 и 75 мг/кг. Препаратами сравнения были выбраны цитиколин (500 мг/кг), цитофлавин (130 мг/кг), холина альфосцерат (100 мг/кг).

3.2.1 Влияние ФДЭС на поведение животных в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Гипоксия является мощным стрессорным фактором для организма животного и вызываемые ею изменения проявляются как на уровне метаболических реакций, так и в поведении мышей. Чувство страха и тревоги, вызываемое гипоксией, преобладают над исследовательскими инстинктами и, как следствие, происходит значительное снижение ориентировочно - исследовательского поведения (ОИП) контрольной группы мышей [Воронина Т.А., 2009].

Анализ значений поведенческих показателей животных при исходном исследовании не выявил статистически достоверных различий между ними. Это позволило, всех включенные в исследование животных отнести к генеральной совокупности, а различия между ними на последующих этапах исследования трактовать как связанные исключительно с хроническим гипоксическим стрессом, создаваемым в модели ДИНГ, и влиянием фармакологических агентов.

В контрольной группе в тесте «Открытое поле» после двухнедельной ДИНГ наблюдали статистически достоверное снижение общей двигательной и поисковой активности животных (на 24% и 29% соответственно) и повышение значений агрессивности и эмоциональной лабильности (на 244% и 89% соответственно), что свидетельствует о наличии у животных признаков хронического стресса и формирующегося невротического состояния (астенизация + эмоциональная лабильность + агрессивность) (Таблица 7).

Т. Г. Урманчеева и В. А. Хасабова в эксперименте с вживленными в мозг обезьян электродов показали, что лобная кора, гиппокамп и гипоталамус являются структурами, наиболее чувствительными к снижению кислорода [Урманчеева Т.Г., 1988].

Таблица 7 – Влияние исследуемых препаратов на поведение лабораторных животных в тесте «Открытое поле»

Группа	ОДА, у.е.	ПИА, у.е.	Аг, у.е.	ЭЛ, у.е.
	Исходный уровень			
Интактные	109,2 ± 4,8	14,1 ± 1,1	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Контрольная	109,4 ± 3,3	14,1 ± 0,8	0,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2
ФДЭС, 10 мг/кг	120,6 ± 3,7	16,3 ± 1,0	0,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2
ФДЭС, 75 мг/кг	118,7 ± 7,3	17,7 ± 2,0	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,4

Продолжение таблицы 7

Группа	ОДА, у.е.	ПИА, у.е.	Аг, у.е.	ЭЛ, у.е.
	Исходный уровень			
Цитиколин	$117,3 \pm 2,8$	$15,3 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$
Цитофлавин	$108,3 \pm 5,8$	$17,0 \pm 1,3$	$1,1 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,3$
Холина альфосцерат	$109,0 \pm 5,0$	$15,7 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$
Через 2 недели				
Интактные	$95,8 \pm 8,3$	$12,8 \pm 1,0$	$1,3 \pm 0,30$	$1,6 \pm 0,28$
Контрольная	$83,1 \pm 6,1^1$	$10,0 \pm 0,6^{1,2}$	$3,1 \pm 0,44^1$	$3,6 \pm 0,3^1$
ФДЭС, 10 мг/кг	$107,8 \pm 4,7^{1,2}$	$12,9 \pm 0,9^{1,2}$	$1,2 \pm 0,2^{1,2}$	$2,4 \pm 0,4^{1,2}$
ФДЭС, 75 мг/кг	$99,6 \pm 1,7^1$	$12,6 \pm 0,8^{1,2}$	$2,8 \pm 0,5^1$	$2,8 \pm 0,2^{1,2}$
Цитиколин	$102,8 \pm 1,3^{1,2}$	$11,8 \pm 1,9^1$	$2,6 \pm 0,4^1$	$1,6 \pm 0,3^2$

Продолжение таблицы 7

Группа	ОДА, у.е.	ПИА, у.е.	Аг, у.е.	ЭЛ, у.е.
	Через 2 недели			
Цитофлавин	$87,7 \pm 5,4^1$	$13,2 \pm 0,5^{1,2}$	$2,4 \pm 0,7^1$	$2,5 \pm 0,3^{1,2}$
Холина альфосцерат	$93,2 \pm 4,3^1$	$12,5 \pm 0,6^{1,2}$	$2,5 \pm 0,3^1$	$2,7 \pm 0,5^{1,2}$
Примечание – 1 – достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ($p < 0,05$); 2 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$); ОДА – общая двигательная активность; ПИА – поисково-исследовательская активность; Аг – агрессивность, ЭЛ – эмоциональная лабильность				

Следует полагать, что названные образования – зоны приложения гипоксического воздействия в головном мозге. Учитывая, что кора и лимбическая система – это высшие звенья центральной нервной системы, организующие ответные реакции на эмоциональное воздействие, можно обосновать отрицательное влияние ДИНГ на психоэмоциональные реакции животных.

На фоне курсового применения исследуемых препаратов отмечалось частичное восстановление поведенческих характеристик лабораторных животных, но ни один из препаратов не обеспечивал полную защиту. На рисунке 12 и 13 представлены данные, характеризующие эффект ДИНГ на фоне курсового введения препаратов в отношении двух типичных показателей – общей двигательной активности и агрессивности (Рисунок 12, 13).

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.

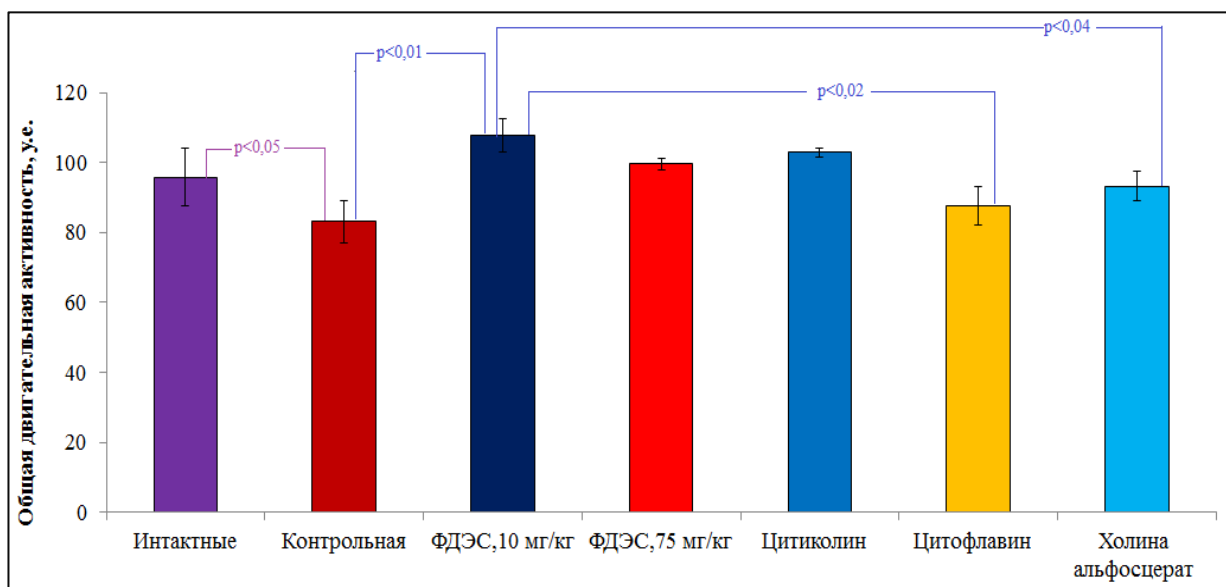


Рисунок 12 – Влияние исследуемых препаратов на общую двигательную активность в тесте «Открытое поле» на фоне ДИНГ

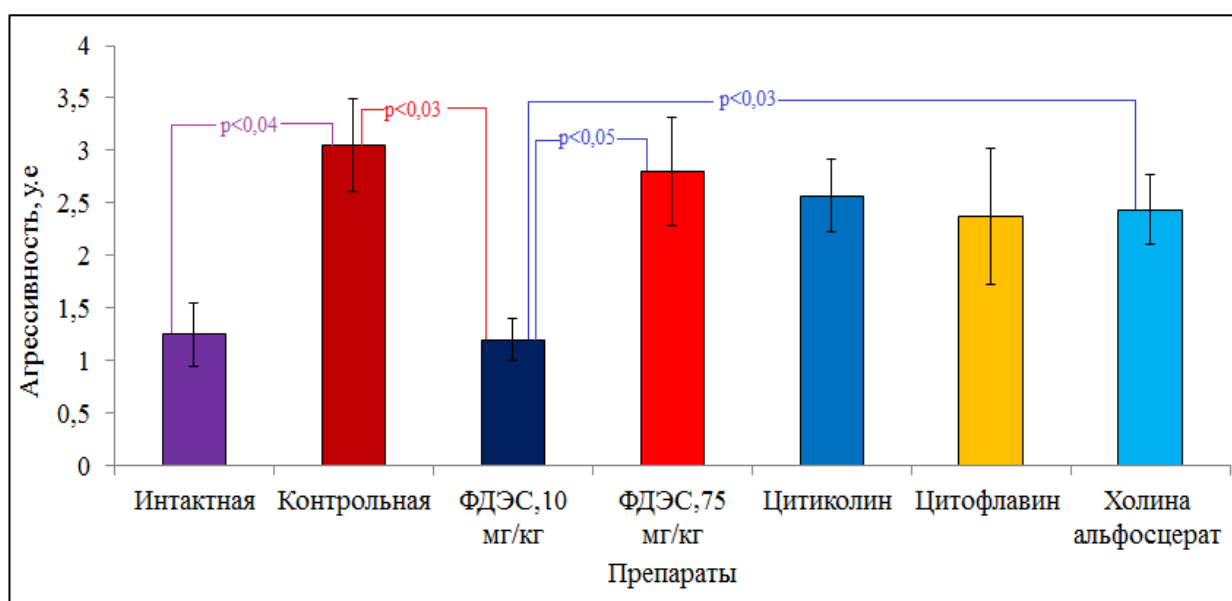


Рисунок 13 – Влияние ФДЭС на агрессивность в тесте «Открытое поле» на фоне ДИНГ

Увеличение дозы ФДЭС до 75 мг/кг при курсовом приеме было явно избыточным (ухудшались показатели эмоциональной лабильности, снижались защитные эффекты по другим показателям).

Наиболее сбалансированным защитным действием на модели ДИНГ обладал цитиколин, оказавший умеренное защитное действие по всем анализируемым показателям. Рассчитанные Индексы защиты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Индексы защиты исследуемых препаратов по показателям поведенческих реакций животных

Препарат	ОДА	ПИА	Аг	ЭЛ
ФДЭС, 10 мг/кг	0,58*	0,28*	0,43*	-0,11
ФДЭС, 75 мг/кг	0,33	0	0,14	-0,74*
Цитиколин	0,46*	0,21	0,44	0,74*
Цитофлавин	0,21	0,24	0,56*	0,11
Холина альфосцерат	0,38	0,31*	0,62*	0,24

Примечание –* – Защитный эффект статистически достоверен, $p < 0,05$ (по критерию метода точной вероятности Фишера). ОДА – общая двигательная активность. ПИА – поисково-исследовательская активность, АГ – агрессивность, ЭЛ – эмоциональная лабильность

Для препарата холина альфосцерата наиболее отчетливые защитные эффекты проявлялись в отношении агрессивности и поисково-исследовательской активности.

Препарат цитофлавин в дозе 130 мг/кг на модели ДИНГ не проявил комплексного защитного действия, но способствовал нормализации показателя эмоциональной лабильности.

При анализе таблицы 8 обращает на себя внимание определенная общность защитного действия на модели ДИНГ для эффективных доз ФДЭС (10 мг/кг), цитиколина и холина альфосцерата, что позволяет предположить, что в механизме действия ФДЭС существенную роль играет холинергический механизм.

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» было установлено, что под воздействием ДИНГ в контрольной группе животных отмечались следующие статистически достоверные изменения ($p < 0,05$): время нахождения в открытом рукаве уменьшалось 4,25 раза, количество заходов в открытый рукав снижалось в 5 раз, время нахождения в закрытом рукаве увеличивалось на 57%, количество заходов в открытый рукав сократилось в 3 раза, а время нахождения на центральной площадке – в 2,5 раза, ориентировочная активность животных снижалась в 4 раза, а их эмоциональная лабильность повышалась в 4 раза по сравнению с исходными значениями этих показателей. Такая динамика показателей однозначно интерпретируется как выраженное тревожно-невротическое состояние.

У животных, которым вводили в курсовом варианте на фоне ДИНГ исследуемые препараты, отмечена положительная динамика, проявляющаяся снижением выраженности тревожно-невротического состояния (Рисунки 14-17).

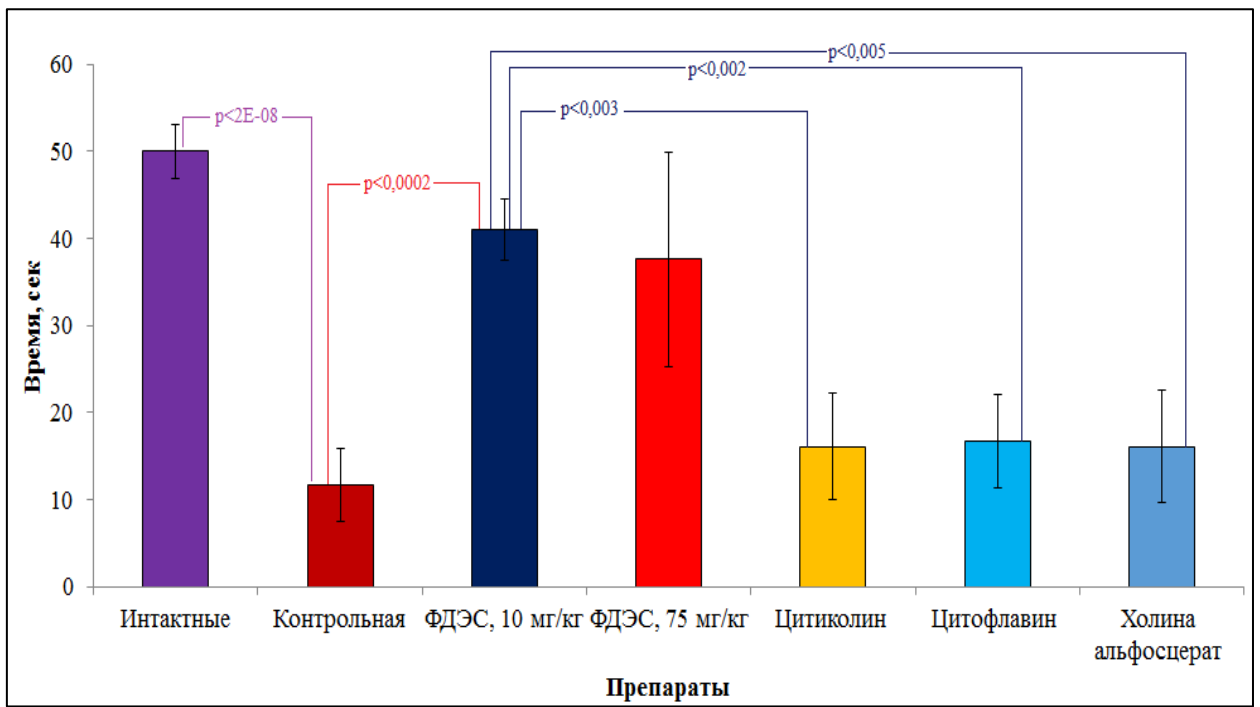


Рисунок 14 – Влияние ФДЭС на время нахождения в открытом рукаве в тесте «ПКЛ» на фоне ДИНГ

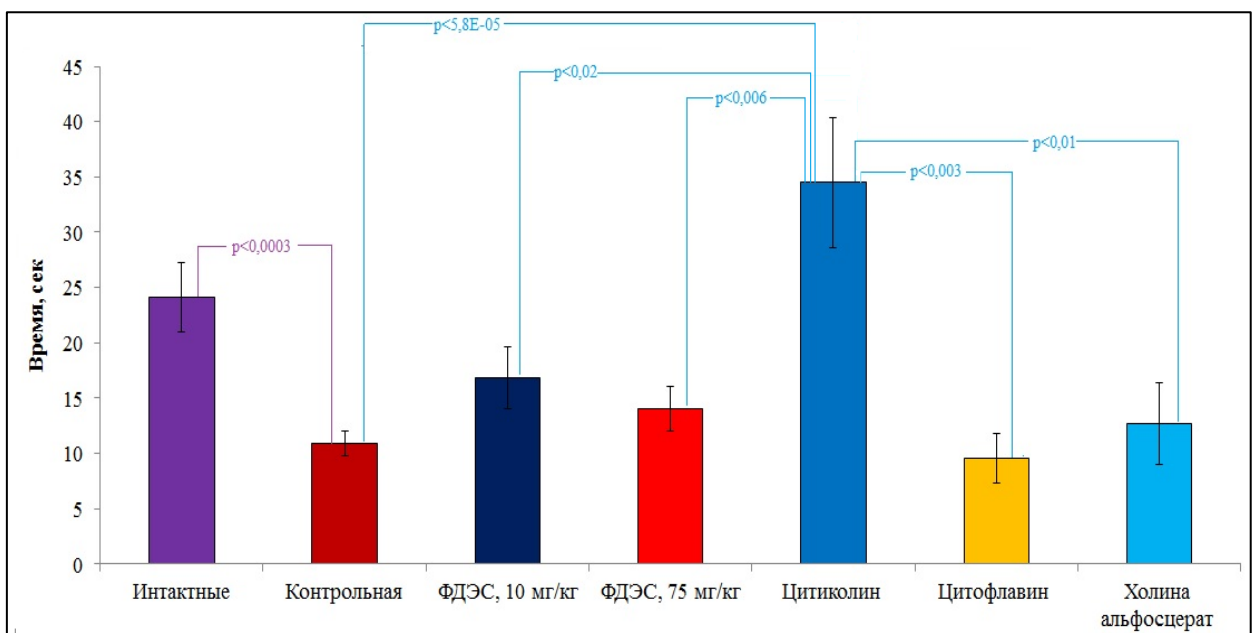


Рисунок 15 – Влияние ФДЭС на время нахождения на центральной площадке в тесте «ПКЛ» на фоне ДИНГ

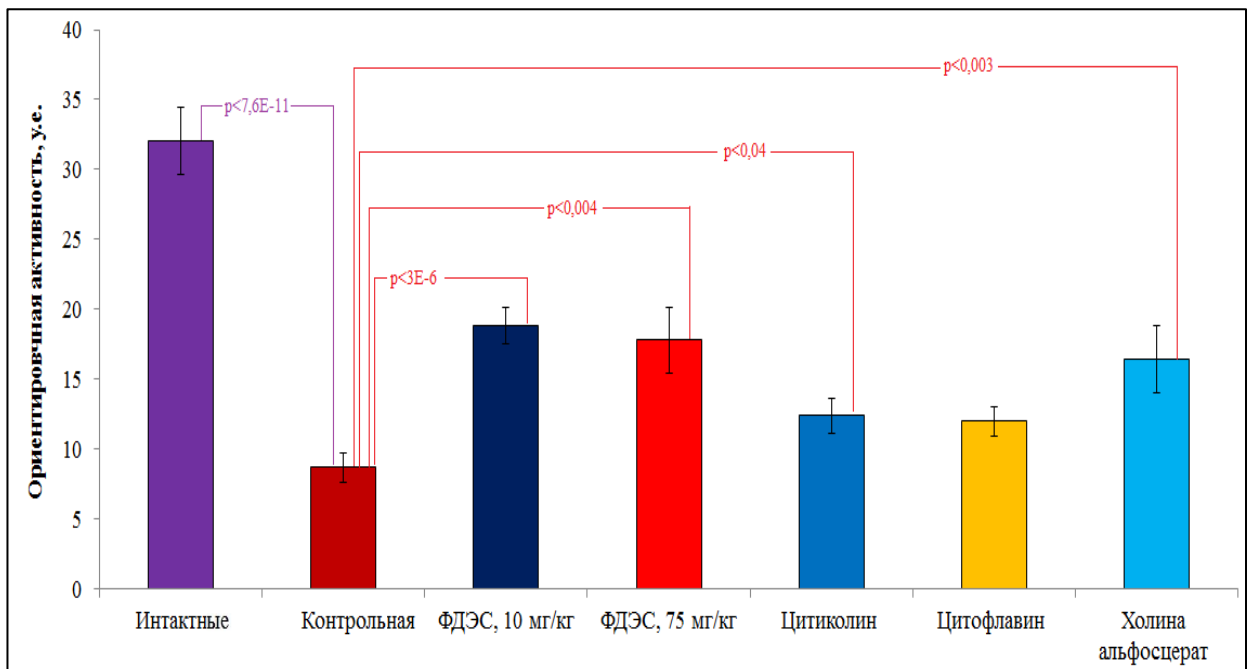


Рисунок 16 – Влияние ФДЭС на ориентировочную активность в тесте «ПКЛ» на модели ДИНГ

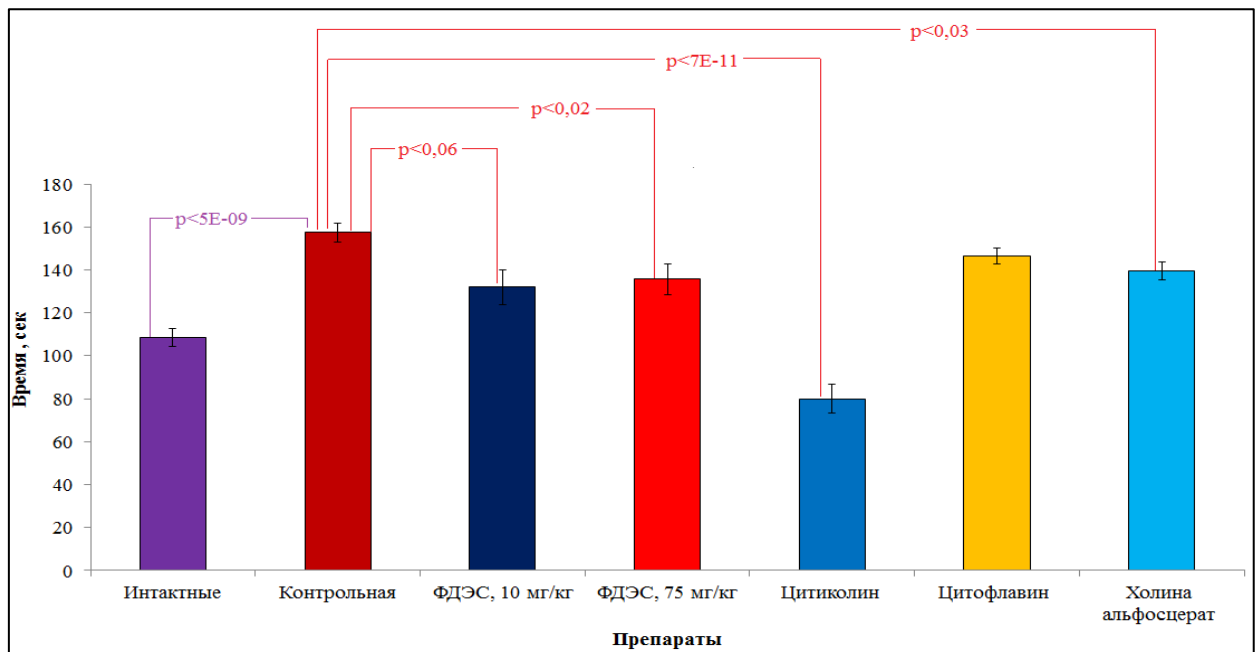


Рисунок 17 – Влияние ФДЭС на время нахождения в закрытом рукаве в тесте «ПКЛ» на фоне ДИНГ

Результаты теста ПКЛ на фоне двухнедельной ДИНГ представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Влияние исследуемых препаратов на поведение лабораторных животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на фоне ДИНГ

Группы	Время нахождения в открытом рукаве, сек	Количество заходов в открытый рукав, у.е.	Время нахождения в закрытом рукаве, сек	Количество заходов в закрытый рукав, у.е.	Время нахождения на центральной площадке, сек	Латентный период первого захода в открытый рукав, сек	Ориентировочная активность, у.е.	Эмоциональная лабильность, у.е.
	Исходный уровень							
Интактные	52,5±6,6	5,2±0,6	101,8±6,6	6,3±0,6	25,8±2,7	26,81±6,0	35,9±0,8	1,6±0,4
Контрольная	52,2 ± 4,4	5,0 ± 0,4	101,8 ± 4,3	6,6 ± 0,5	26,0 ± 2,8	24,9 ± 4,0	33,7 ± 1,6	1,3 ± 0,3
ФДЭС 10 мг/кг	55,7 ± 4,6	5,1 ± 0,5	99,8 ± 15,1	6,9 ± 0,7	24,6 ± 2,3	22,6 ± 6,0	36,5 ± 2,2	1,4 ± 0,4
ФДЭС 75 мг/кг	51,3 ± 6,3	5,3 ± 0,7	103,6 ± 6,6	5,6 ± 0,6	29,5 ± 5,7	25,6 ± 3,6	34,9 ± 1,8	1,3 ± 0,3
Цитиколин	54,5 ± 5,7	4,9 ± 0,5	101,9 ± 6,4	6,6 ± 0,6	23,6 ± 2,8	25,3 ± 5,5	34,5 ± 2,8	1,6 ± 0,3
Цитофлавин	50,5 ± 3,6	5,3 ± 0,5	105,3 ± 3,6	5,3 ± 0,5	24,3 ± 2,3	31,4 ± 9,6	33,0 ± 1,4	1,1 ± 0,4
Холина альфосцерат	56,0 ± 7,6	5,3 ± 0,5	105,6 ± 3,5	5,3 ± 0,5	28,8 ± 3,5	31,4 ± 9,5	32,0 ± 1,6	1,1 ± 0,4

Продолжение таблицы 9

Группы	Время нахождения в открытом рукаве, сек	Количество заходов в открытый рукав, у.е.	Время нахождения в закрытом рукаве, сек	Количество заходов в закрытый рукав, у.е.	Время нахождения на центральной площадке, сек	Латентный период первого захода в открытый рукав, сек	Ориентировочная активность, у.е.	Эмоциональная лабильность, у.е.
Через 2 недели								
Интактные	50,0 ± 3,1	5,1 ± 0,9	108,4 ± 4,1	5,3 ± 0,6	24,1 ± 3,2	28,0 ± 4,6	32,0 ± 2,4	2,0 ± 0,2
Контрольная	11,7 ± 4,2 ¹	1,1 ± 0,2 ¹	157,3 ± 4,6 ¹	2,4 ± 0,5 ¹	10,9 ± 1,1 ¹	122,7 ± 14,6 ¹	8,7 ± 1,1 ¹	5,3 ± 0,4 ¹
ФДЭС 10 мг/кг	41,0 ± 3,5 ^{1,2}	3,4 ± 0,5 ¹	131,4 ± 8,3 ¹	4,8 ± 0,6 ¹	16,8 ± 2,8 ^{1,2}	48,7 ± 81,7 ^{1,2}	18,8 ± 1,3 ^{1,2}	2,7 ± 0,5 ^{1,2}
ФДЭС 75 мг/кг	37,6 ± 12,3 ^{1,2}	3,0 ± 0,7 ¹	135,8 ± 7,2 ¹	3,0 ± 0,5 ¹	14,0 ± 2,0 ¹	65,4 ± 17,3 ^{1,2}	17,8 ± 2,4 ¹	3,5 ± 0,3 ^{1,2}
Цитиколин	16,1 ± 6,1 ¹	2,2 ± 0,3 ¹	79,9 ± 7,0 ¹	4,1 ± 0,6 ¹	34,5 ± 5,9 ^{1,2}	91,1 ± 22,0 ¹	12,4 ± 1,2 ^{1,2}	3,5 ± 0,4 ^{1,2}
Цитофлавин	16,7 ± 5,3 ¹	3,0 ± 0,7 ^{1,2}	146,4 ± 3,6 ¹	3,1 ± 0,4 ¹	9,6 ± 2,3 ¹	79,8 ± 24,6 ^{1,2}	12,0 ± 1,1 ¹	4,5 ± 0,5 ^{1,2}
Холина альфосцерат	16,1 ± 6,5 ¹	1,4 ± 0,5 ¹	139,6 ± 4,2 ¹	2,5 ± 0,5 ¹	12,7 ± 3,7 ¹	69,3 ± 17,8 ^{1,2}	16,4 ± 2,4 ¹	3,0 ± 0,7 ^{1,2}
Примечание – 1 – достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ((р<0,05)); 2 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы (р<0,05)								

Сравнительная оценка протекторного действия исследуемых лекарственных средств на модели ДИНГ по показателям теста «ПКЛ» выполнена по рассчитанным на основании данных таблицы 10 среднегрупповым Индексам защиты (Таблица 10).

Таблица 10 – Среднегрупповые Индексы защиты при двухнедельном курсовом введении исследуемых препаратов на фоне ДИНГ

Показатель	ФДЭС, 10 мг/кг	ФДЭС, 75 мг/кг	Цитиколин	Цитофлавин	Холина альфосцерат
ВНОР	0,65	0,67	0,08	0,13	0,07
КЗОР	0,50	0,50	0,25	0,50	0
ВНЗР	0,43	0,43	1,40	0,28	0,40
КЗЗР	0,52	0,27	0,36	0,35	0,17
ВНЦП	0,46	0,08	1,82	0	0,05
ЛППЗОР	0,66	0,58	0,26	0,56	0,66
ОА	0,34	0,34	0,11	0,13	0,32
ЭЛ	0,70	0,45	0,61	0	0,44

Примечание – ВНОР – время нахождения в открытом рукаве, КЗОР – количество заходов в открытый рукав, ВНЗР – время нахождения в закрытом рукаве, КЗЗР – количество заходов в закрытый рукав, ВНЦП – время нахождения на центральной площадке, ЛППЗОР – латентный период первого захода в открытый рукав, ОА – ориентировочная активность, ЭЛ – эмоциональная лабильность

На фоне ДИНГ цитиколин способствовал, снижению времени пребывания животных в закрытом рукаве на 50 % и статистически достоверно увеличивал время пребывания на центральной площадке (в 3 раза по сравнению с контрольной группой). Такие изменения показателей характерны для препаратов с противотревожным и антидепрессивным действием. Эти данные согласуются со способностью выявленной способностью препарата частично компенсировать вызванную ДИНГ

повышение эмоциональной лабильности. На остальные показатели теста, чувствительные к воздействию ДИНГ, цитиколин не оказывал существенного влияния.

Опубликованы результаты многочисленных экспериментальных работ, направленных на изучение влияния цитиколина на гипоксию и ишемию мозга. На лабораторных животных установлено, что цитиколин в условиях гипоксии и ишемии мозга стабилизирует уровни дофамина и норадреналина в мозге, ослабляя гемодинамические эффекты, вызванные гипоксией, оказывает нейрометаболическое действие, улучшая энергетический метаболизм головного мозга, активно встраивается в поврежденные клеточные мембраны [Alberghina M. et al. 1981; Boismare F., 1978a; Boismare F., 1978b]. В различных исследованиях было выявлено, что цитиколин препятствует распаду клеточных мембран во время гипоксии/ишемии мозга, увеличивая синтез структурных фосфолипидов, оказывает нейропротективное действие, которое проявляется в восстановлении психоэмоциональное состояние после гипоксического воздействия, что согласуется с полученными результатами в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». [D'Orlando K.J. et al. 1995; Horrocks L.A. et al., 1981; Hurtado O. et al., 2011; Nagaoka A., 1985; Rao A.M. et al., 1999]. В исследовании M.E. Tornos et al. изучено антитоксическое действие цитиколина в экспериментальной модели гипоксии, вызванной цианидом калия [Tornos M.E. et al., 1983]. Введение цитиколина лабораторным животным в течение 4 дней до индукции гипоксии оказывало защитное действие: получавшие препарат животные выживали достоверно дольше. Авторы связали данный феномен с активацией энергетического метаболизма и повышением активности митохондриальной цитохромоксидазы в головном мозге, вызванными данным препаратом [Tornos M.E. et al., 1983].

Препарат цитофлавин оказывал умеренное, но статистически не достоверное восстанавливающее влияние на показатели заходов животных в

открытый рукав (количество и латентный период первого захода) без влияния на другие исследуемые показатели. Эти эффекты предположительно можно трактовались как легкое антиастеническое действие [Бобков Ю.Г., 1984].

Холина альфосцерат при курсовом введении на фоне ДИНГ оказывал умеренное защитное действие в отношении показателей латентного периода первого захода в открытый рукав, ориентировочной активности, времени нахождения в закрытом рукаве и эмоциональной лабильности. При попадании в организм холина альфосцерат расщепляется под действием ферментов на холин и глицерофосфат. Холин участвует в биосинтезе ацетилхолина — одного из основных нейромедиаторов, глицерофосфат является предшественником фосфолипидов (фосфатидилхолина) мембраны нейрона. Таким образом, холина альфосцерат усиливает церебральную холинергическую проводимость и положительно воздействует на пластичность нейрональных мембран [Monzani D. et al., 2010]. Вследствие чего, такое изменение показателей на фоне хронического гипоксического стресса может характеризовать ноотропную активность этого препарата.

При анализе данных таблицы 10 обращает на себя внимание, что ключевые параметры формирующегося под влиянием ДИНГ связанного с хронической гипоксией тревожно-невротического состояния (время и количество заходов в открытый и закрытый рукава) в основном устойчивы к действию референсных препаратов. Вероятно, это может связано с тем, что для них не характерно сочетание антигипоксической и антиастенической, ноотропной активности. Однако такое сочетание характерно для ФДЭС. Его антигипоксическая активность оценена в разделе 3.1, а антиастеническая – в материалах оценки защитного действия при ДИНГ по динамике показателей тестов «Открытое поле» и «ПКЛ».

Так, в тесте «ПКЛ» показано (таблица 9, 10), что ФДЭС в обеих исследованных дозах (10 и 75 мг/кг) проявляет на модели ДИНГ выраженное защитное действие ($ИЗ > 0,5$) в отношении показателей ВНОР, КЗОР,

ЛППЗОР, и умеренное защитное действие ($0,30 < \text{ИЗ} < 0,50$) в отношении показателей ВНЗР, ОА. Для дозы 10 мг/кг также проявляется защитное действие в отношении показателей КЗЗР ($\text{ИЗ}=0,52$), ВНЦП ($\text{ИЗ}=0,46$) и ЭЛ ($\text{ИЗ}=0,70$), в то время как для дозы 75 мг/кг эти эффекты были выражены слабее.

Таким образом, полученные в тесте «ПКЛ» данные свидетельствуют, что на модели ДИНГ, приводящей у лабораторных животных к формированию хронического гипоксического стресса, курсовое применение ФДЭС в оптимальной дозе (10 мг/кг) замедляло формирование и снижало выраженность тревожных, невротических (астенических) проявлений и частично поддерживало ориентировочно-исследовательскую деятельность животных. Можно полагать, что эти эффекты связаны с антигипоксическим, нейропротекторным и ноотропным действием препарата.

3.2.2 Влияние ФДЭС на биохимические показатели в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии

На фоне ДИНГ в контрольной группе животных отмечается достоверное повышение уровня глюкозы и лактата крови на 31% и 35% соответственно по отношению к интактным животным (Таблица 11).

Таблица 11 – Влияние исследуемых препаратов на уровень глюкозы и лактата в крови под воздействием ДИНГ

№ п/п	Группа	Уровень глюкозы, ммоль/л	Уровень лактата, ммоль/л
1.	Интактная	$5,63 \pm 0,12$	$2,88 \pm 0,17$

Продолжение таблицы 11

№ п/п	Группа	Уровень глюкозы, ммоль/л	Уровень лактата, ммоль/л
2.	Контрольная	$7,36 \pm 0,29^1$	$3,89 \pm 0,2^1$
3.	ФДЭС, 10 мг/кг	$9,04 \pm 0,27^{1,2}$	$3,14 \pm 0,1^2$
4.	ФДЭС, 75 мг/кг	$8,62 \pm 0,28^{1,2}$	$4,66 \pm 0,41^1$
5.	Цитиколин	$7,27 \pm 0,22^1$	$3,7 \pm 0,2^1$
6.	Цитофлавин	$8,5 \pm 0,36^{1,2}$	$4,15 \pm 0,51^1$
7.	Холина альфосцерат	$7,6 \pm 0,33^1$	$3,93 \pm 0,56^1$
Примечание – 1 – достоверные отличия от интактной группы ($p < 0,05$); 2 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$)			

Такая динамика подтверждает особенность модели ДИНГ – формирование хронического гипоксического стресса. О состоянии гипоксии свидетельствует повышение уровня лактата, о состоянии стресса – гипергликемия [Takanashi Y., 2001].

Обращает на себя внимание, что ни один из исследуемых препаратов не снижал уровень глюкозы (Рисунок 18), а некоторые из них (ФДЭС, цитофлавин) усиливали гипергликемическую реакцию на ДИНГ (отмечалось

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.

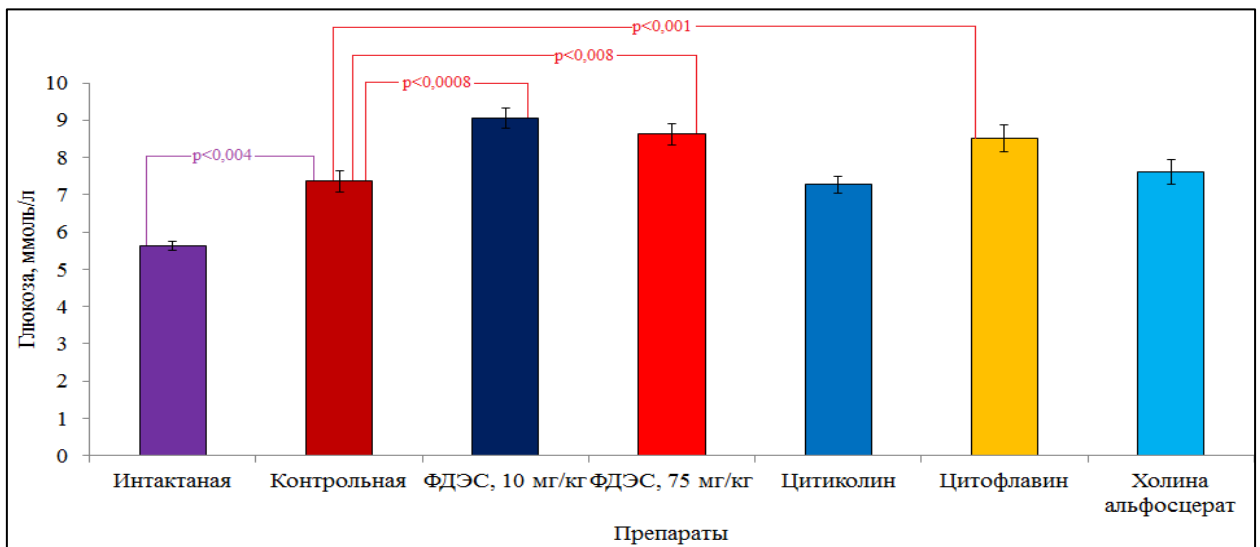


Рисунок 18 – Влияние исследуемых препаратов на уровень глюкозы на фоне ДИНГ

Препараты цитиколин и холина альфосцерат, для которых ведущим является холинергическое действие, не стимулировали дополнительное повышение уровня глюкозы в крови животных.

В отношении лактата крови препарат ФДЭС в дозе 10 мг/кг оказывал достоверный защитный эффект (ИЗ=0,74, ($p<0,05$)). В исследованиях Pieralisi G., была показана способность ДМАЭ тартрат и битартрат снижать выраженность лактацидоза и по сравнению с плацебо [Pieralisi G., 1990].

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, сокращением утилизации глюкозы клетками и повышением уровня глюкозы в крови. Другие исследователи предположили, что увеличение данного показателя может быть связано либо со снижением утилизации глюкозы в организме [Khoury N., 2011; Peltonen G.L. et al., 2012], либо со снижением глюкозостимулированной секреции инсулина [Jun J.C. et al., 2014] или с повышением эндогенной продукцией глюкозы [Yi C.X. et al., 2010; Shin M.K. et al., 2014]. Однако, есть предположение, что гипоксия мало влияет на чувствительность к инсулину и толерантность к глюкозе, но реализует свое действие через влияние на клиренс инсулина [Simpson E.J. et al., 2016]. На экспериментальных моделях у животных установлено, что липолиз, усиливающийся в ответ на воздействие хронической интермиттирующей гипоксии, приводит к включению жирных кислот в обменные процессы, в том числе и глюконеогенез, что на фоне 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 (Таблица 12) [Honchar O.O., 2007, Maiti P. et al., 2006].

Таблица 12 – Влияние исследуемых препаратов на активность глутатионпероксидазы и каталазы на модели ДИНГ

№ п/п	Группа	Активность глутатионпероксидазы, нмоль/с/мг белка	Активность каталазы, нмоль/с/мг белка
1.	Интактная	387,06±14,88	34,72±3,28

Продолжение таблицы 12

№ п/п	Группа	Активность глутатионпероксидазы, нмоль/с/мг белка	Активность каталазы, нмоль/с/мг белка
2.	Контрольная	309,36±24,32 ¹	50,15±5,05 ¹
3.	ФДЭС, 10 мг/кг	497,83±35,54 ^{1,2}	48,90±5,6 ¹
4.	ФДЭС, 75 мг/кг	568,46±54,43 ^{1,2}	51,49±5,29 ¹
5.	Цитиколин	435,14±59,10 ²	64,71±10,35 ¹
6.	Цитофлавин	294,67±12,66 ¹	57,85±5,20 ¹
7.	Холина альфосцерат	336,65±24,66	66,20±5,58 ^{1,2}
Примечание – 1 – достоверные отличия от интактной группы (p<0,05); 2 – достоверные отличия от контрольной группы (p<0,05)			

Известно, что каталаза является субстратактивируемым ферментом, и ее активность повышается 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].

Курсовое применение референсных препаратов цитиколина, цитофлавина и холина альфосцерата оказывало дополнительную активацию каталазы (на 23-47%) (Рисунок 19). Однако, выявленная динамика носила статистически достоверный характер только для холина альфосцерата.

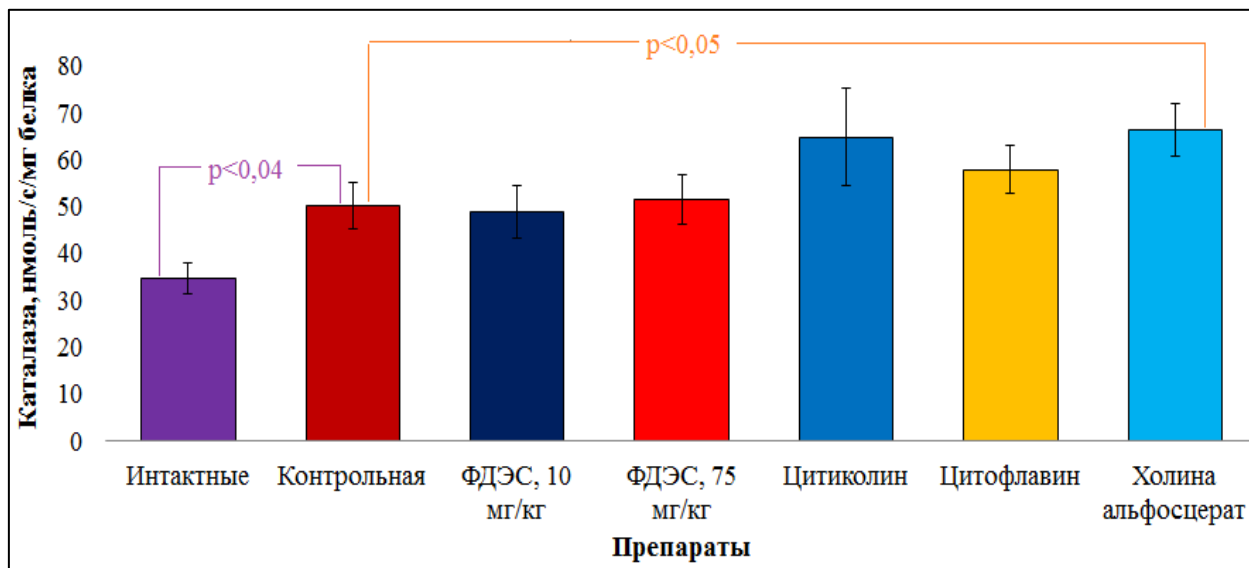


Рисунок 19 – Влияние исследуемых препаратов на активность каталазы

На активность каталазы ФДЭС в обеих исследованных дозах не оказывал никакого влияния.

Известно, что уровень активности внутриклеточных ферментативных антиоксидантных систем, в частности, СОД и каталазы, генетически детерминирован. Причем, избыточное накопление в клетках супероксидного анион - радикала или перекиси водорода сопровождается дерепрессией участков генома, ответственных за активность ферментов антирадикальной защиты клеток. В связи с этим очевидно, что обнаруженное нами возрастание активности каталазы носит адаптивно - компенсаторный характер в ответ на образование АФК [Зайцев В.Г., 1998; Чеснокова Н.П., 2004].

Курсовое применение ФДЭС на фоне ДИНГ оказывало выраженный дозозависимый эффект активации 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, что отражает собственное влияние препарата. По литературным данным производные аминоктанолв способны уменьшать процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижая образование малонового диальдегида (МД), лизофосфолипидов и повышая активность супероксиддисмутазы (СОД) и уровень восстановленного глутатиона (GSH) в тканях (Рисунок 20) [Karen E., 2002].

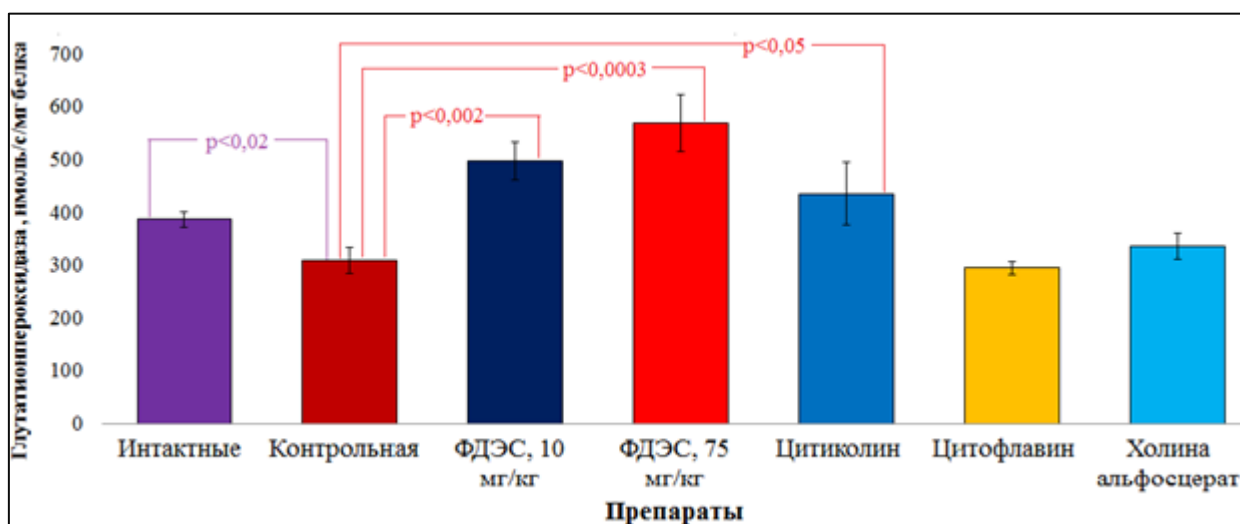


Рисунок 20 – Влияние исследуемых препаратов на активность глутатионпероксидазы

В проведенном исследовании удалось установить 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 стрессу, повышению активности эндогенной антиоксидантной системы клеток за счет стимуляции синтеза глутатиона - неферментного фактора и повышению активности фермента глутатионредуктазы [Arakawa S., 2005].

На активность глутатионпероксидазы цитофлавин и холина альфосцерат не влияли.

3.2.3 Влияние ФДЭС на показатели гемограммы

Анализ таблицы 13 показывает, что в ответ на хроническое гипоксическое воздействие у животных контрольной группы по сравнению с интактными животными статистически достоверно повышается уровень, как эритроцитов, так и гемоглобина (на 7% и 15% соответственно), что является закономерной реакцией системы крови [Пахрова О. А., 2016].

Таблица 13 – Влияние исследуемых препаратов показатели гемограммы подвоздействием ДИНГ

№ п/п	Группа	Эритроциты, 10^{12} клеток/л	Гемоглобин, г/л	Средний объем эритроцитов, фл
1.	Интактная	$9,64 \pm 0,28$	$150,65 \pm 4,36$	$47,65 \pm 0,82$
2.	Контрольная	$10,31 \pm 0,20^1$	$173,94 \pm 3,73^1$	$49,81 \pm 0,92$
3.	ФДЭС, 10 мг/кг	$10,88 \pm 0,28^1$	$175,37 \pm 4,44^1$	$48,58 \pm 1,03$
4.	ФДЭС, 75 мг/кг	$11,97 \pm 0,28^{1,2}$	$180,29 \pm 3,22^1$	$45,24 \pm 1,36^2$
5.	Цитиколин	$11,56 \pm 0,27^{1,2}$	$183,77 \pm 4,27^1$	$47,59 \pm 0,72$
6.	Цитофлавин	$10,68 \pm 0,23^1$	$165,90 \pm 3,59^1$	$47,20 \pm 1,04$
7.	Холина Альфосцерат	$9,92 \pm 0,47$	$164,00 \pm 4,74^1$	$47,64 \pm 1,10$
Примечание –1 – достоверные отличия от соответствующего показателя интактной группы ($p < 0,05$); 2 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$)				

Объем эритроцитов при этом имел тенденцию к некоторому увеличению (на 4,5%, ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о том, что увеличение количества эритроцитов и гемоглобина связано не с активацией эритропоэза и синтезом «юных» эритроцитов, а выбросом в кровоток «старых» эритроцитов из тканевых депо (селезенка, костный мозг, печень). Для препаратов ФДЭС в дозе 10 мг/кг и цитиколин было характерно усиление этой реакции, цитофлавин практически не влиял на нее, а холина альфосцерат – несколько ослаблял выброс эритроцитов из тканевых депо.

Обращает на себя внимание, что гематологический ответ на ДИНГ при курсовом введении ФДЭС в дозе 75 мг/кг был достоверно более выраженным, чем при введении плацебо (+15% по количеству эритроцитов, +4,5% по уровню гемоглобина) и сопровождался снижением среднего объема эритроцитов (на 5% по сравнению с интактными животными), что является признаком стимуляции эритропоэза и появлением в крови «юных», незрелых форм эритроцитов [Пахрова О.А., 2016]. Входящая состав ФДЭС и цитифлавина 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; Yanni S.E. et al., 2009; Zhang Y., Daaka Y., 2011].

Повышение уровня эритроцитов и гемоглобина в крови также может быть связано с активацией железосодержащего белка HIF-1 (Hypoxia inducible factor) при гипоксии, который усиливает экспрессию гена эритропоэтина, вследствие чего увеличивается синтез эритропоэтина и эритропоэз [Павлов А.Д., 2011; Qingdong K., 2006; Sendoel A., 2010; Zagorska A., 2004].

Изучение нейропротекторной активности ФДЭС в условиях экспериментальной ишемии головного мозга

В данном разделе изучена нейропротекторная активность ФДЭС в условиях экспериментальной ишемии головного мозга на модели перманентной перевязки общих сонных артерий. Опыты проведены на 84 крысах самцах массой 200-250 г, количество животных в группах – по 12 шт.

3.3.1 Влияние ФДЭС на выживаемость животных после перманентной перевязки общих сонных артерий

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 (Таблица 14).

Таблица 14 – Влияние исследуемых препаратов на выживаемость крыс после двусторонней необратимой перевязкой обеих общих сонных артерий

Группа	Время регистрации летальных исходов от момента операции, сутки				
	1-е Сутки	3-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
	n/N	n/N	n/N	n/N	n/N
ЛО	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Контроль	6/12	5/12	4/12	4/12	4/12
ФДЭС, 10 мг/кг	8/12	7/12	7/12	7/12	7/12
ФДЭС, 75 мг/кг	8/12	8/12	8/12	8/12	8/12
Цитиколин	7/12	7/12	6/12	6/12	6/12
Цитофлавин	6/12	5/12	3/12	3/12	3/12

Продолжение таблицы 14

Группа	Время регистрации летальных исходов от момента операции, сутки				
	1-е Сутки	3-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
	n/N	n/N	n/N	n/N	n/N
Холина альфосцерат	6/12	4/12	4/12	4/12	3/12
Примечание – N – количество животных в группе; n – количество выживших животных в группе; ЛО – ложнооперированные животные					

В группе цитиколина выживаемость составила 50% (+17% к контрольной группе, $p < 0,05$). В эксперименте, проведенном Z. M. Önal 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].

В проведенном исследовании не удалось выявить влияния цитофлавина (170 мг/кг) и холина альфосцерата (100 мг/кг) на летальность животных после перманентной перевязки обеих сонных артерий. Однако, в другом исследовании, при использовании цитофлавина в дозе 175 мг/кг, наблюдалось снижение смертности до 54,8% [Бульон В.В., 2004]. Такие различия в летальности, очевидно, могут быть обусловлены тем, что авторами использовалась неполная перевязка общих сонных артерий, т.к. кровотоков по одной из артерий снижался только на 50%.

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% (не достоверно). В исследованиях Макаровой Л.М. была продемонстрирована способность другого производного аминокетанола деанола ацеглумата снижать смертность при билатеральной окклюзии общих сонных артерий, за

счет снижения накопления как первичных, так и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в церебральной ткани, ограничения развития фазы реактивной гиперемии и нивелирования фазы гипоперфузии [Макарова Л.М., 2006].

3.3.2 Влияние ФДЭС на координацию движений при ишемии головного мозга

Ишемическое повреждение головного мозга приводило к нарушению координации движений. Так, в контрольной группе крыс время удержания на выражающемся стержне достоверно снизилось в 4,2 раза по сравнению с исходными значениями, в то время как в группах ФДЭС в обеих дозах этот показатель повысился в среднем в 1,5 раза, достоверно отличаясь от значений контрольной группы (Таблица 15). Также отмечено частичное восстановление этого показателя при применении референсных препаратов. В группе цитофлавина животные находились на вращающемся стержне в среднем в 3,4 раза меньше по сравнению с исходным показателем ($p < 0,05$). У животных, получавших цитиколин, наблюдали снижение времени удержания в 1,8 раза по отношению к начальному показателю ($p < 0,05$). ФДЭС в обеих дозах достоверно превосходил группу контроля в 2,9 раза, цитофлавина в 2,3 раза и был сопоставим с цитиколином.

Таблица 15 – Влияние исследуемых препаратов на координацию движений

Группа животных	Время удержания на вращающемся стержне, сек	
	Исходный уровень	Итоговый уровень
Интактная	$218,2 \pm 17,2$	$197,28 \pm 20,31$
Контрольная	$202,4 \pm 5,8$	$48,24 \pm 9,10^1$
ФДЭС, 10 мг/кг	$207,2 \pm 23,0$	$138,20 \pm 33,83^{1.2}$

С целью сравнения нейропротекторной активности препаратов был рассчитан их Индекс защиты (Таблица 16).

Таблица 16 – Индексы защиты координационных функций животных с ишемией головного мозга на фоне курсового приема исследуемых лекарственных средств

Группа	Контроль	ФДЭС 10, мг/кг	ФДЭС 75, мг/кг	Цитико- лин	Цитоф- лавин	Холина альфос- церат
ИЗ	0	0,56	0,54	0,40	0,09	0,24
Примечание – ИЗ – индекс защиты						

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. et al., 2012]. Как и в работах других исследователей, показано влияние цитиколина на нейропластичность после экспериментального инсульта, которое способствовало восстановлению двигательных и когнитивных навыков у животных [Diederich K. et al., 2012; Hurtado O. et al., 2007]. У цитофлавина нейропротекторная активность на модели перевязки сонных артерий не была обнаружена.

3.3.3 Изучение влияния ФДЭС на поведение животных в «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 (Таблица 17). 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.

Таблица 17 – Влияние исследуемых препаратов на поведение крыс с ишемией головного мозга в тесте «Открытое поле»

Группа	ОДА, у.е.	ПИА, у.е.	Аг, у.е.	ЭЛ, у.е.
	Исходный уровень			
ЛО	48,1 ± 7,6	11,1 ± 0,7	1,9 ± 0,3	2,0 ± 0,3
Контрольная	52,0 ± 7,3	12,00 ± 0,83	2,0 ± 0,1	1,50 ± 0,3

Продолжение таблицы 17

Группа	ОДА, у.е.	ПИА, у.е.	Аг, у.е.	ЭЛ, у.е.
	Исходный уровень			
ФДЭС 10 мг/кг	50,3 ± 4,3	12,83 ± 0,70	1,7 ± 0,4	1,3 ± 0,5
ФДЭС 75 мг/кг	51,1 ± 4,4	11,14 ± 1,47	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,3
Цитиколин	55,8 ± 4,5	11,3 ± 0,55	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,8
Цитофлавин	50,6 ± 6,8	12,0 ± 0,83	2,0 ± 0,3	1,2 ± 0,5
Холина альфосцерат	55,8 ± 4,8	14,5 ± 1,6	2,3 ± 0,5	2,0 ± 0,9
Группа	ОДА, у.е.	ПИА, у.е.	Аг, у.е.	ЭЛ, у.е.
	Через 21 день			
ЛО	41,6 ± 7,3	9,9 ± 0,4 ¹	1,6 ± 0,5	2,0 ± 0,3
Контрольная	9,3 ± 1,3 ¹	2,3 ± 0,5 ¹	5,3 ± 0,8 ¹	5,5 ± 0,9 ¹
ФДЭС, 10 мг/кг	28,5 ± 6,9 ^{1,2}	6,3 ± 0,7 ^{1,2}	2,0 ± 0,5 ²	3,0 ± 0,5 ^{1,2}
ФДЭС, 75 мг/кг	18,6 ± 5,8 ^{1,2}	3,6 ± 0,4 ^{1,2}	2,4 ± 0,7 ^{1,2}	3,7 ± 0,7 ^{1,2}
Цитиколин	18,0 ± 3,5 ^{1,2}	3,0 ± 0,3 ¹	3,3 ± 0,2 ^{1,2}	3,0 ± 0,3 ²
Цитофлавин	20,3 ± 2,0 ^{1,2}	3,7 ± 0,9 ¹	4,3 ± 0,9 ¹	3,6 ± 0,7 ^{1,2}
Холина альфосцерат	25,3 ± 7,7 ¹	5,0 ± 1,5 ¹	2,1 ± 1,1 ²	4,3 ± 2,0
Примечание – 1 – достроенные отличия от соответствующего исходного показателя (p<0,05); 2 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы (p<0,05); ЛО – ложнооперированные животные; ОДА – общая двигательная активность; ПИА – поисково-исследовательская активность; Аг – агрессивность, ЭЛ – эмоциональная лабильность				

В таблице 18 представлены индексы защиты исследуемых препаратов в отношении показателей поведенческой активности животных с хронической ишемией мозга. Данные показывают, что цитиколин проявляет умеренное корректирующее действие в отношении показателей эмоциональной сферы животных (эмоциональная лабильность и агрессивность), что согласуется с данными, которые были получены ранее в исследовании Lee H.J. В данном эксперименте группе животных, которым в течение 21 сут вводили цитиколин, после двустороннего закрытия общих сонных артерий у крыс отмечены положительные эффекты в виде достоверного улучшения поведения и уменьшения степени поражения белого вещества головного мозга (лейкоареоза) по сравнению с группой крыс, получавших плацебо [Lee H.J. et al., 2009].

Таблица 18 – Индексы защиты препаратов на фоне курсового приема исследуемых лекарственных средств в условиях ишемией головного мозга

Показатель	ФДЭС, 10 мг/кг	ФДЭС, 75 мг/кг	Цитиколин	Цитофлавин	Холина альфосцерат
ОДА	0,43	0,24	0,18	0,27	0,35
ПИА	0,36	0,17	0,10	0,14	0,17
Аг	0,89	0,57	0,50	0,30	0,11
ЭЛ	0,51	0	0,75	0,25	0,57
Примечание – ОДА – Общая двигательная активность, ПИА – поисково-исследовательская активность, Аг – агрессивность, ЭЛ – эмоциональная активность					

Кроме того, цитиколин на экспериментальной модели ишемии головного мозга у гипертензивных крыс, вызванной перевязкой средней мозговой артерии, уменьшал повреждение клеточных мембран нейронов, ослаблял поведенческие расстройства [Aronowski J. et al., 1996].

Холина альфосцерат оказывал умеренное защитное действие в отношении эмоциональной лабильности. Следовательно, можно

предположить, что для препаратов с холинергическим механизмом действия их профилактическое введение перед окклюзией сонных артерий позволяет обеспечить нейропротекторное действие в эмоциогенных структурах мозга – лимбической системе, ядрах среднего мозга и в корковой зоне, с которой связаны такие поведенческие показатели, как общая двигательная и поисково-исследовательская активность.

Цитофлавин не проявил защитного действия в этой модели. Однако в исследовании Бульона В.В., где ишемию головного мозга вызывали посредством перевязки левой общей сонной артерии и ограничения кровотока по правой общей сонной артерии до 50% от исходного уровня было показано, что цитофлавин к 21-м суткам ишемии значительно улучшал горизонтальную двигательную активность и эмоциональный компонент поведения крыс [Бульон В.В. и др., 2004].

ФДЭС в дозе 10 мг/кг также был более активен в отношении показателей эмоциональной сферы, оказывал защитное действие и в отношении собственно поведенческой активности (ОДА (ИЗ=0,43), ПИА (ИЗ=0,36)), превосходил по эффективности препараты сравнения. Вероятно, его влияние проявляется и в повышении энергетических возможностей корковых нейронов.

Обращает на себя внимание, что более высокая доза ФДЭС оказывает заметно менее выраженное защитное действие, а в отношении показателя ЭЛ он вообще не проявил защитного действия. Эти результаты, характеризующие дополнительное влияние (не всегда положительное) на эмоциональную лабильность, коррелируют с данными в отношении этого показателя на другой модели, в которой также использовался тест «Открытое поле» - хронического гипоксического стресса (модель ДИНГ).

Влияние ФДЭС на когнитивные функции

В исследованиях изучено влияние ФДЭС дозах 10 и 75 мг/кг на когнитивные функции лабораторных животных в тестах «Условный рефлекс пассивного избегания», «Экстраполяционное избавление», «Т-лабиринт». Препаратом сравнения был выбран эталонный ноотроп-пирацетам в дозе 900 мг/кг.

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% животных. Скополамин значительно ухудшал этот показатель, снижая число обученных крыс до 16 и 41% соответственно. Под влиянием пирацетама 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) (Рисунок 21).

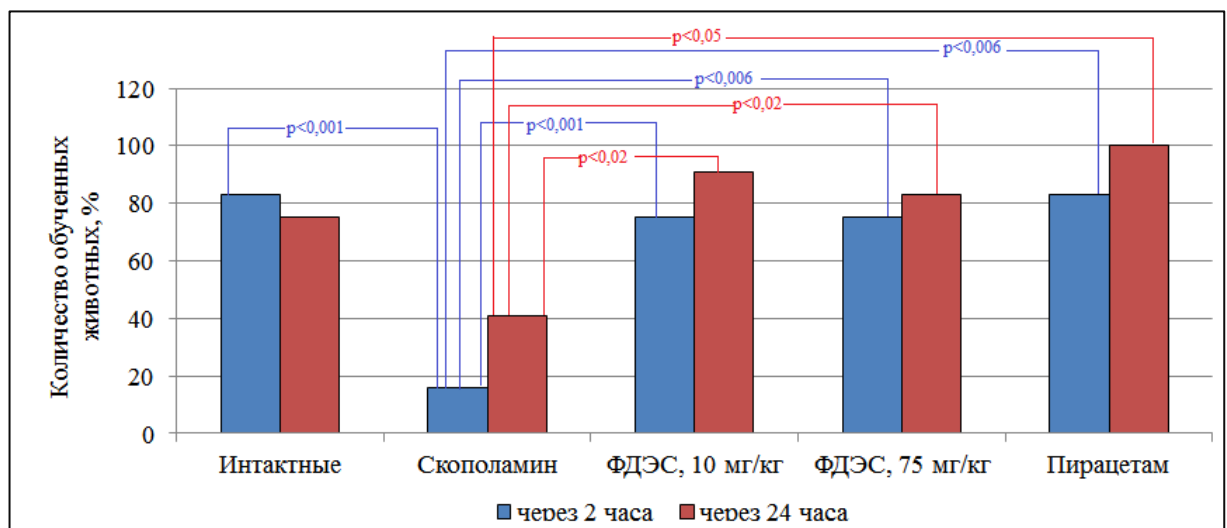


Рисунок 21 – Влияние ФДЭС на сохранение памятного следа в тесте УРПИ

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 (Таблица 19). Также вызывало резкое сокращение латентного периода первого захода в темный отсек, что свидетельствует о неустойчивости памятного следа.

Пирацетам 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 1,09 и 1,22 для дозы 75 мг/кг). У животных этих групп время нахождения в светлой камере значительно преобладало над временем нахождения в тёмной камере, а заходы животных в тёмную камеру были ошибочными и на непродолжительный срок. Эффект ФДЭС был сопоставим с действием пирацетама.

В тесте ЭПИ изучалась способность исследуемых препаратов сохранять памятный след о способе избегания от водной среды через 14 дней. В контрольной группе животных время начала движения животных увеличивалось, что свидетельствует об отсутствии памятного следа о решении задачи, но наличия знания об относительной безопасности тестовых условий. Повторное предъявление теста животным через 2 недели воспринималось ими 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 (Таблица 20).

Таблица 20 – Влияние исследуемых препаратов на формирование и воспроизведение памятного следа в тесте ЭПИ

Показатель	Группа			
	Контроль	ФДЭС, 10 мг/кг	ФДЭС, 75 мг/кг	Пирацетам
Исходно				
Латентное время начала движений, сек	3,8 ± 0,8	3,6 ± 0,6	3,9 ± 1,8	3,4 ± 1,1

Продолжение таблицы 20

Латентное время подныривания, сек	$45,15 \pm 14,3$	$49,39 \pm 15,6$	$51,7 \pm 15,2$	$52,3 \pm 14,4$
% крыс решивших экстраполяционную задачу	70	70	70	70
После 14 дней введения препаратов				
Латентное время начала движений, сек	$7,6 \pm 2,4^1$	$1,1 \pm 0,1^{1,2}$	$2,3 \pm 0,7^2$	$5,2 \pm 1,16$
Латентное подныривания, сек	$77,0 \pm 10,1^1$	$35,1 \pm 11,1^2$	$31,2 \pm 14,8^2$	$33,9 \pm 10,7^2$
% крыс решивших экстраполяционную задачу	60	90	80	90
Примечание – 1 – достроенные отличия от соответствующего исходного показателя ($p < 0,05$); 2 – достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$)				

Обучение животных в тесте ЭПИ на фоне применения пирацетама на 35% сокращало время решения задачи, доля животных, успешно решивших экстраполяционную задачу, увеличивалась на 20% (с 70 до 90%), что свидетельствует о сохранении ранее выработанного в ходе обучения памятного следа.

Применение ФДЭС в обеих дозах также, как и пирацетама, способствовало более быстрому и качественному решению экстраполяционной задачи, что подтверждает наличие у этого фармакологического агента отчетливого и статистически достоверного

ноотропного действия. Различия в эффектах разных доз практически отсутствовало. Специфической особенностью ФДЭС можно считать наличие дополнительного растормаживающего действия, которое проявлялось снижением латентного времени начала движения животных с 7,1 секунды в контрольной группе до 1,1 секунды в группе с приемом ФДЭС в дозе 10 мг/кг

Модели обучения животных в лабиринтах являются наиболее адекватными для изучения процессов памяти, так как создаваемые условия соответствуют естественной среде обитания. Хорошо развитая пространственная память мелких грызунов позволяет исследовать их поведение в лабиринтах различной степени сложности. Модель обучения мышей в Т-образном лабиринте с пищевым подкреплением является одной из распространенных моделей лабиринтного обучения.

Установлено, что 100% животных контрольной группы не сохранили навык выбора «правильного рукава» (Таблица 21), то есть тест «Т-лабиринт» может рассматриваться как тест оперативной памяти, при проведении которого у животных не фиксируется длительный памятный след.

Таблица 21 – Влияние ФДЭС на когнитивные функции в тесте «Т-лабиринт»

Группа	Количество животных, сохранившие навык выбора «правильного» рукава после окончания обучения, %		
	1 –й день	5-й день	10-й день
Контрольная	0	0	0
Пирацетам	28,5 ¹	28,5 ¹	0
ФДЭС, 10 мг/кг	50 ¹	62,5 ^{1,2}	50 ^{1,2}
ФДЭС, 75 мг/кг	87,5 ^{1,2}	87,5 ^{1,2}	50 ^{1,2}
Примечание – 1 – достоверные отличия от контрольной группы (p<0,05); 2 – достоверные отличия от группы пирацетама (p<0,05)			

Холинергическая система является важным компонентом формирования памяти и нейрональной пластичности [Rasmusson D.D., 2000; Warburton E. C., 2003], а ее нарушения приводят к заметным негативным изменениям [Fernandes M.A., 2000; Sarter M., 2005]. Кроме того, ухудшение памяти – хорошо известный эффект холиноблокаторов [Drachman D. A., 1977].

ФДЭС в обеих исследованных дозах существенно повышал эффективность обучения, запоминания и воспроизведения информации у животных, что подтверждает установленное в тестах УРПИ, ЭПИ и Т-лабиринт ноотропное действие этого соединения. При этом, в отличие от серии с тестами ЭПИ и УРПИ, в Т-лабиринте выявленный эффект является дозозависимым (прием более высокой дозы сопровождается более высоким эффектом), но не пропорциональным (увеличение дозы ФДЭС в 7,5 раз ведет к усилению эффекта на 25-35% с нивелированием разницы к 10-му дню).

Продолжительно, механизм действия ФДЭС может быть связан с тем, что входящий в состав препарата диэтиламиноэтанол обеспечивает синтез ацетилхолина и фосфатидилхолина нейрональных мембран [Akesson B., 1977]. Однако, достаточна низкая несубстратная доза препарата, в которой он оказывает свой эффект, не позволяет рассматривать этот механизм как ведущий. Возможно, в такой низкой дозе ФДЭС, как и другие производные аминоэтанола, может непосредственно взаимодействовать с холинергическими рецепторами или же стимулировать выброс ацетилхолина [Pomeroy A.R., 1972; Kostopoulos G.K., 1975].

В исследовании Николаевой И.Г. и др., 2010, проведенном на крысах, было показано, что введение пирацетама в дозе 200 мг/кг вызывает выработку рефлекса в тесте «Т-лабиринт» на 4-й день у 40 % крыс, на 10-й день – у всех животных в группе. Через 7 дней навык сохранялся у 94% животных [Николаева И.Г., 2010]. Такой эффект препарата некоторые авторы объясняют его влиянием на холинергическую и глутаматергическую системы, играющие ведущую роль в реализации интеллектуально-

мнестических функций мозга. Так, показано, что пирацетам стимулирует биосинтез ацетилхолина, обратный захват холина в синаптической щели и увеличивает плотность М-холинорецепторов во фронтальной коре [Pilch H. et al., 1988]. Также он избирательно активирует АМРА подтип глутаматных рецепторов, не влияя на другие их подтипы [Pedata F. et al., 1984]. Этот факт важен в связи с тем, что именно с активацией АМРА-рецепторов связывается формирование долговременной памяти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность поиска новых ноотропных средств обусловлена, с одной стороны, высоким удельным весом сосудистых заболеваний мозга в структуре заболеваемости и смертности населения, высокими показателями временной нетрудоспособности и первичной инвалидизации [Скворцова В.И., 2006]. С другой стороны, результативность терапии у данной категории больных остаётся низкой.

В связи с этим, представляется очевидной потребность в новых эффективных ноотропных средствах, которые могли бы улучшить прогноз, предупреждая развитие нейродегенеративных процессов мозга, а следовательно, улучшали бы качество жизни такой категории пациентов и, вместе с тем, имели бы низкую токсичность, хороший профиль переносимости и являлись бы безопасными для пациентов при длительном применении.

Однако несмотря на то, что эффективность многих веществ была продемонстрирована в исследованиях у животных, случаи доказанной эффективности нейропротекторных препаратов в клинических условиях остаются весьма редкими [Hurtado O., 2005; Kakihana M., 1988; Schabitz W.R., 1996; Hurtado O., 2008]. Так, как на данный момент единственным препаратом с доказанными как в лабораторных условиях, так и в контролируемых клинических исследованиях эффективностью и безопасностью, является цитиколин, отмеченный в ряде национальных и международных рекомендаций по лечению инсульта. [Денисов И.Н., 2013, ESO, 2008].

Отличительной особенностью строения производного аминокэтанола является наличие фармакофорной группировки диэтиламинокэтанола (предшественника холина), образующего связь с бутандиовой (янтарной) и транс-бутендиовой кислотами. Мы предполагаем, что именно встраивание в

молекулу интермедиатов цикла Кребса придает соединению выраженное антигипоксическое действие.

В результате первичного скринингового исследования на модели ОНГ установлено, что ФДЭС обладает выраженным антигипоксическим действием в дозах в широком диапазоне доз, от 10 до 800 мг/кг. Оптимальными для дальнейшего докинического исследования были дозы 10 и 75 мг/кг.

Проведены скрининговые исследования по определению антигипоксических доз ФДЭС. Исследования выполнены на модели острой нормобарической гипоксии. Установлено, что ФДЭС повышал устойчивость мышечной ткани к воздействию гипоксии в широком диапазоне доз от 10 мг/кг до 800 мг/кг, однако наиболее значимые результаты были получены в интервале доз от 10 мг/кг до 75 мг/кг.

Экспериментальные исследования по изучению антигипоксической активности нового соединения - производного аминокетанола 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.

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

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.

При изучении показателей гемограммы под воздействием ДИНГ было установлено достоверное увеличение количества эритроцитов во всех опытных группах. Однако наибольшее изменение наблюдали в дозе ФДЭС 75 мг/кг. Возможно, входящая состав ФДЭС янтарная кислота, воздействуя на SUCNR1 рецепторы в гемopoэтических прогениторных клетках, индуцирует клеточную пролиферацию и защиту от апотоза [Шустов Е.Б., Оковитый С.В., 2015]. Повышение уровня эритроцитов и гемоглобина в крови связано с активацией железосодержащего белка HIF-1 (Hypoxia inducible factor) при гипоксии, который усиливает экспрессию гена эритропоэтина, вследствие чего увеличивается синтез эритропоэтина и эритропоэз.

Определение активности глутатионпероксидаз (GPx) является важным этапом исследований препаратов с предполагаемым нейропротекторным действием. Ферменты группы GPx катализируют тиолзависимое восстановление H_2O_2 и органических гидропероксидов. Это свойство обуславливает их защитную роль при окислительном стрессе. В клетках головного мозга важную роль играет цитозольная форма изофермента Gpx4 - это один из основных нейропротекторных ферментов [Flohé L., 2012; Razygraev A.V., 2016].

ФДЭС стимулирует эритропоэз и снижает образование активных форм соединений кислорода, а также препятствовал развитию лактоацидоза.

Соединение - производное аминоксанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) 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 антианамнестического действия ФДЭС сопоставима с таковой у пирацетама.

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-диэтилэтанаминация} 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-диэтилэтанаминация} 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 активирует эритропоэз.

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

4. Бис{2-[(2e)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминация} 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 сходимость. 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат
- Аг – агрессивность
- АМФ – аденозинмонофосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ВНОР – время нахождения в открытом рукаве
- ВНР – время нахождения в закрытом рукаве
- ВНЦП – время нахождения на центральной площадке
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ГГС – гипоксическая газовая смесь
- Д – дефекация
- ДИНГ – длительная интермиттирующая нормобарическая гипоксия
- КВР – количество выглядываний из рукавов
- КЗОР – количество заходов в открытый рукав
- КЗЗР – количество заходов в закрытый рукав
- КС – количество стоек
- ЛППЗОР – латентный период первого захода в открытый рукав
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- ОГемГ – острая гемическая гипоксия
- ОГтГ – острая гистотоксическая гипоксия
- ОДА – общая двигательная активность
- ОНГ – острая нормобарическая гипоксия
- ОП – открытое поле
- ПИА – поисково-исследовательская активность
- ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
- ПОСА – перевязка двух общих сонных артерий

СДГ – синдром дефицита внимания и гиперактивности

У – уринация

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ФАД – флавинадениндинуклеотид

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

ФС – фармацевтическая субстанция

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЦТК – цикла трикарбоновых кислот

ЭЛ – эмоциональная лабильность

ЭПИ – экстраполяционное избавление

ЯК – янтарная кислота

АМРА – рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

DEAE – диэтиламиноэтанол

DMAEP-Glu– диметиламиноэтанол пироглутамат

HGB – гемоглобин

MCV– средний объем эритроцита

NAA – N-ацетил-аспартат

NFkB – nuclear factor kB; ядерный фактор kB

НМДА – N-метил-D-аспартатные рецептор

RBC – число эритроцитов

Panx – паннексиновые каналы

PI3K – фосфатидилинозитол-3 киназа

VEGF –vascular endothelial growth factor; фактор роста эндотелия сосудов

МАРК – mitogen-activated protein kinase; митоген-активируемая протеинкиназа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, А.Е. Антигипоксическая активность и механизмы действия некоторых синтетических и природных соединений / А.Е. Александрова // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2005. – Т. 68. – №5. – С. 72 – 78.
2. Александровский, Ю.А. Применение препарата «Нооклерин» в качестве антиастенического средства у больных с функциональной астенией / Ю.А. Александровский, А.С. Аведисова, Д.В. Ястребов и др. // Психиатрия и психофармакотерапия. Журнал им. П.Б. Ганнушкина. – 2004.– №4.– С. 164—166.
3. Афанасьев, В.В. Особенности применения цитофлавина в современной клинической практике / В.В. Афанасьев, И.Ю. Лукьянова // – СПб.: Тактик-Студио, 2010. – 80 с.
4. Бобков, Ю.Г. Фармакологическая коррекция утомления / Ю. Г. Бобков, В.М. Виноградов, В.Ф. Каткови и др. // – М.: Медицина, – 1984. – 208 с.
5. Бондаренко, Н.А. Избирательный эффект нейролептиков на нарушение дофамин-зависимого поведения у крыс в тесте экстрополяционного избавления / Н.А. Бондаренко // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1990. – №11. — С. 506–508.
6. Бульон, В.В. Антиамнестический эффект цитофлавина и нейронола при ишемическом нарушении мозгового кровообращения у крыс / В.В. Бульон, Ю. О. Федотова, А. Л. Коваленко и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67. – №5. – С. 5-8.
7. Бульон, В.В. Сравнительное изучение влияния цитофлавина и нейронола на морфологические изменения в головном мозге и выживаемость крыс с ишемическим нарушением мозгового кровообращения / В.В., Бульон,

И.Б., Крылова, Н.Р. Евдокимова и др. // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2004. – Т. 137. – №4. – С. 467-470.

8. Воронина Т.А. Экспериментальная психофармакология ноотропов. Фармакология ноотропов (ред. Вальдман А. В., Воронина Т. А.). — М.: Медицина, 1989. — С. 91–98.

9. Воронина, Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов / Т. А. Воронина // Неврология и психиатрия. – 2012. – Т. 112. – С. 12.

10. Воронина, Т.А. Антиоксидант мексидол. Основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина, // Психофармакология и биологическая наркология. – 2001. – Т. 1. – №1. – С. 2–12.

11. Воронина, Т.А. Мексидол. Основные нейropsychотропные эффекты и механизм действия / Т.А.Воронина // Лекарственное обеспечение. Поликлиника №5.– 2009. – С. 32-36.

12. Галагудза, М.М. Пре- и посткондиционирование как способы защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения: Автореф. дис... д -ра мед. наук. — СПб., 2007. — 46 с.

13. Денисов, И.Н. Клинические рекомендации диагностика и тактика при инсульте в условиях общей врачебной практики, включая первичную и вторичную профилактику / И.Н. Денисов, Д.В. Кандыба, О.Ю. Кузницова // – 2013. – 33 с.

14. Зайцев, В.Г. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. / В.Г. Зайцев, В.И. Закревский // Вестник Волгоградской медицинской академии. Волгоград. – 1998. – Т.54. – №4. – С.49-53.

15. Зарубина, И.В. Основные метаболические эффекты антигипоксантов и их энергетическое обеспечение. Автореф. дисс. ... доктора биол. наук. – СПб.: ВМедА, 1999. – 40 с.

16. Зарубина, И.В. Молекулярная фармакология антигипоксантов / И.В. Зарубина, П. Д. Шабанов // СПб. : Изд-во Н-Л. — 2004. — С. 368.

17. Зарубина, И.В. Антиоксидантные эффекты метаболических протекторов при экспериментальном травматическом токсикозе / И.В. Зарубина, И.А. Юнусов, П.Д. Шабанов // Медико–биологические и социально–психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2010. – Т. 58 – №3 – С. 69–72.

18. Зарубина, И.В. Влияние цитофлавина на биоэнергетические процессы в печени при тяжелой компрессионной травме конечностей / И.В. Зарубина, И.А. Юнусов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – №6. – С. 42-45.

19. Ианг, И. Повреждение гематоэнцефалического барьера при острых и хронических цереброваскулярных заболеваниях / И. Ианг, Г.А. Розенберг // Журнал Национальной ассоциации по борьбе с инсультом / Stroke / Российское издание. – 2012. – №1. – С. 91-96.

20. Ивницкий, Ю.Ю. Янтарная кислота в системе средств метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма / Ю. Ю. Ивницкий, А. И. Головкин, Г. А. Софронов // СПб.: Лань. – 1998. – С. 16-25.

21. Катунина, Н.П. Противогипоксическая активность новых производных пиридина и 3-оксипиридина / Н.П., Катунина, А.Ю. Рылеев, П.Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2011. – №1. – С.58-62.

22. Кирова, Ю.И. Регуляторная роль сукцинатзависимых сигнальных систем (HIF-1 α и SUCNR1) при адаптации к гипоксии: Автореф. дисс. ... доктора биол. наук. – М: ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии, 2016.

23. Кондрашова, М.Н. Реципрокная регуляция дыхания и структурного состояния митохондрий гормонально-субстратной системой / М. Н. Кондрашова // Митохондрии, клетки и активные формы кислорода. Пущино, 2000. — С. 71 - 74.

24. Кондрашова, М.Н. Трансаминазный цикл окисления субстратов в клетке как механизм адаптации к гипоксии // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний / Под ред. Л.Д. Лукьяновой. - М.: ВИНТИ, 1989. - С. 51-66.

25. Кондрашова, М.Н. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве / М.Н. Кондрашова, Ю.Г. Каминский, Е.И. Маевский. – Пущино, 1996. – С. 300.

26. Кондрашова, М.Н. Адаптация к гипоксии путем переключения метаболитов на окисление янтарной кислоты / М.Н. Кондрашова, Е.И. Маевский, Г.В. Бабаян // Митохондрии. Биохимия и ультраструктура / Под ред. С.Е. Северина. – М.: – Наука, 1973. – С.112-129.

27. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №1. – С. 2-8.

28. Левченкова, О.С. Новиков В. Е., Пожилова Е. В. Фармакодинамика и клиническое применение антигипоксантов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2012. – Т. 10. – №3. – С. 3-12.

29. Лукьянова, Л.Д. Антигипоксанты – новый класс фармакологических веществ // Итоги науки и техники / Под ред. Л.Д. Лукьяновой. – М. : ВИНТИ. – 1991. – Т. 124. – С. 5-25.

30. Лукьянова, Л.Д. Биоэнергетические механизмы формирования гипоксических состояний и подходы к их фармакологической коррекции // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний / Под ред. Л.Д. Лукьяновой. – М. : ВИНТИ. – 1989. – С. 11- 44.

31. Лукьянова, Л.Д. Изменение редокс-реакций ПН срезов коры головного мозга крыс на добавление янтарной кислоты, амитала и пирувата в зависимости от времени переживания и исходного состояния / Л.Д. Лукьянова, В.Н.Карнаухов, В.П.Зинченко и др. / Терапевтическое действие

янтарной кислоты // Под ред. М.Н. Кондрашовой. – Пущино: НЦБИ АН СССР, 1976. – С. 146-150.

32. Лукьянова, Л.Д. Особенности антигипоксического действия мексидола, связанные с его специфическим влиянием на энергетический обмен / Л.Д. Лукьянова, В.Е. Романова, Г.Н. Чернобаева и др. // Хим.-фарм. журнал. – 1990. – №8. – С. 9-11.

33. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2011. — №1. — С. 3–19.

34. Лукьянова, Л.Д. Митохондриальная дисфункция - типовой патологический процесс, молекулярный механизм гипоксии. / Л.Д. Лукьянова, И.Б. Ушаков // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты. М. – 2004. – С 5-31.

35. Лукьянова, Л.Д. Митохондриальная дисфункция – типовой патологический процесс, молекулярный механизм гипоксии // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Под ред. Л.Д. Лукьяновой, И.Б. Ушакова. – М.: Истоки, 2004. – С. 8-50.

36. Лукьянова, Л.Д. Действие интервальной нормобарической гипоксии на кинетические свойства митохондриальных ферментов / Л.Д. Лукьянова, А.М. Дудченко, Т.А. Цыбина и др. // Бюл. эксп. биол. и мед. — 2007. — №12. — С. 644-651.

37. Лукьянова, Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции / Л.Д. Лукьянова // Бюл. эксп. биол. и мед.. – 1997. – Т. 124. – №9. – С. 244-254.

38. Лукьянова, Л.Д. Митохондриальные дисфункции при гипоксии – типовой патологический процесс // Митохондрии в патологии / Под ред. М.Н. Кондрашовой, Ю.Г. Каминского, Е.И. Маевского. – Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2001. – С. 66-67.

39. Лукьянова, Л.Д. Особенности работы дыхательной цепи в условиях кислородной недостаточности // Молекулярные механизмы и

регуляция энергетического обмена. – Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1987. – С. 153-161.

40. Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова, Г.В. Сукоян // Биологические мембраны. – 2012. – №. 4. – С. 238–252.

41. Лукьянова, Л.Д. Изучение влияния периодической адаптации на состояние ЦНС крыс с различной резистентностью к кислородной недостаточности / Л.Д. Лукьянова, С.В. Крапивин, В.Е. Романова и др. // Журнал высшей нервной деятельности. – 1992. – Т. 42 – №1. – С. 164-167.

42. Лукьянова, Л.Д. Энерготропное действие сукцинатсодержащих производных 3-оксипиридина. / Л.Д. Лукьянова, Э.Л. Германова, Т.А. Цыбина и др. // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2009. – Т. 148. – №10. – С. 388-392.

43. Лукьянова, Л.Д. Особенности срочной экспрессии сукцинатзависимого рецептора GPR91 в тканях при гипоксии / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова // Бюл. эксп. биол. и мед. – Т.160, № 2.– С. 703-708.

44. Маевский, Е.И. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий / Е.И. Маевский, А.С. Розенфельд, Е.В. Гришина и др. // Пущино: Ин-т теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 2001. – 155 с.

45. Макарова, Л.М. Изучение противогипоксической активности нооклерина / Л. М. Макарова, М. А. Приходько, В. Е. Погорелый и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – №12. – С.71-73.

46. Мамадалиева, Н.И. Влияние фармакокоррекции на активность ферментов защиты от активных форм кислорода в сердце при адаптации к гипоксии различной интенсивности и длительности / Н. И. Мамадалиева, Т. С. Саатов, З.Р. Хайбуллина и др. // Вестник НГПУ. – 2014. – №1. – С.222-231.

47. Методические рекомендации Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств / под ред. Н.Н. Каркищенко // М., 2017. – С. 98.

48. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д.Лукьяновой. // М., 1990. – 18 с.

49. Моргун, А.В. Современные представления о патогенезе перинатального ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга: молекулы-мишени для нейропротекции / А.В. Моргун, Н. В. Кувачева, Т.Е. Таранушенко и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 68. – №12. – С. 26-35.

50. Николаева, И.Г. Разработка средства, обладающего ноотропной активностью / И.Г. Николаева, Л.Д. Дымшеева // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН - 2010. – Т.72. – №2 – С. 201-204.

51. Новиков, В.Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е.В. Пожилова // Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии. 2014. – №4. – С.13-21.

52. Одинак, М.М. Применение глиатилина в лечении сосудистых когнитивных расстройств / М.М. Одинак, А.Ю., В.Ю. Емелин и др. // Материалы Всероссийской юбилейной научно-практической конференции: Актуальные проблемы клинической неврологии. – 2009. – С. 151.

53. Оковитый, С.В. Антигипоксанты / С.В.Оковитый, А.В. Смирнов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2001. – Т.64. – №3. – С.76-80.

54. Оковитый, С.В. Антигипоксанты в современной клинической практике / С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, В.А. Заплутанов и др. // Клиническая медицина. – 2012. – №9. – С.63-68.

55. Оковитый, С.В. Клиническая фармакология антигипоксантов (I) // ФАРМиндекс: ПРАКТИК, – 2004. – №6. – С. 30-39.

56. Оковитый, С.В. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии / С.В. Оковитый, С.В. Радько, Е.Б.Шустов // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т.49. – №9. – С.24-28.
57. Павлов, А.Д. Эритропоз, эритропоэтин, железо. / А.Д. Павлов, Е.Ф. Морщакова, А.Г. Румянцев // Молекулярные и клинические аспекты. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 299 с.
58. Парфенов, В.А. Вторичная профилактика ишемического инсульта: международные рекомендации и клиническая практика / В.А. Парфенов, С.В. Вербицкая // Неврологический журнал. – 2014. – №2. – С.4-10.
59. Пахрова, О.А. Динамика клеточных показателей эритроцитарной системы при адаптации к острой экспериментальной гипоксии головного мозга в зависимости от уровня стрессоустойчивости / О.А. Пахрова, В.В. Криштоп, О.С. Ленчери др. // Успехи современной науки. – 2016. – Т. 9, №.12. – С. 99-104.
60. Портниченко, В.И. Фазовые изменения энергетического метаболизма при периодической гипоксии / В.И., Портниченко, В.И. Носарь, А. Г. Портниченко и др. // Физиол. журн. – 2012. – Т. 56. – С. 3-12.
61. Путилина, М.В. Современные представления о ноотропных препаратах / М.В. Путилина // Лечащий врач: Журнал для практикующего врача. – 2006, –№5. – С. 10-14.
62. Разыграев, А.В. Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови лабораторных мышей с использованием пероксида водорода и реактива / А.В. Разыграев, Ж.Н. Тумасова, К.М. Пац и др. // Элмана. Бутлеровские сообщения. – 2016. – Т.45. – №2. – С. 123-130.
63. Саватеева-Любимова, Т.Н. Гемато-, нефро- и гепатопротективные эффекты цитофлавина и настойки семян лимонника при интоксикации аминбензолом / Т.Н. Саватеева-Любимова, Е.Е. Лесиовская, К.В. Сивак // Медицина экстремальных ситуаций. – 2008. – Т. 25. – №3. – С.68-75.

64. Салмина, А.Б. НАД⁺-зависимые механизмы нарушения жизнеспособности клеток головного мозга в остром периоде гипоксически-ишемического перинатального поражения / А.Б. Салмина, О.С. Окунева, Н.А. Малиновская и др. // Нейрохимия. – 2008. – Т.25. – №3. – С. 247-254.

65. Семенов, Д.Г. Участие метаботропных глутаматных рецепторов мозга в механизмах гипоксической сигнализации / Д.Г. Семенов, А.В. Беляков, Т.С. Глущенко и др. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. – №3. – С. 11-19.

66. Скворцова, В.И. Церебральная ишемия и нейропротекция / В.И. Скворцова, Н.М. Ефремова, Н.А. Шамалова и др. // Качество жизни. Медицина. – 2006. – №2. – С. 13.

67. Слепнева, Л.В. Механизм повреждения энергетического обмена при гипоксии и возможные пути его коррекции фумаратсодержащими растворами / Л.В. Слепнева, Г.А. Хмылова // Трансфузиология. – 2013. – Т.14 – №2. – С. 49-65.

68. Титович, И.А. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола / И. А. Титович, В.Ц. Болотова // Биомедицина и биомоделирование. – 2016. – №2. – С. 77-83.

69. Урманчеева, Т.Г. Эффекты хронической электростимуляции вентромедиальной области гипоталамуса у обезьян / Т.Г. Урманчеева, В.А. Хасабова // Нормобар. гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации: сб. ст.; под ред. Ю.М. Караша, Р.Б. Стрелкова, А.Я. Чиждова. – М.: Медицина, 1988. – 351с.

70. Федин, А.И. Эффективность нейрометаболического протектора цитофлавина при инфарктах мозга (многоцентровое рандомизированное исследование) / А.И. Федин, С.А. Румянцева, М.А. Пирадов и др. // Вестник Санкт-Петербургской гос. медицинской академии им. И.И. Мечникова. Инсульт. – 2005. – № 1. – С. 13-19.

71. Хочачка, П. Биохимия адаптации / П. Хочачка, Дж Сомеро // М.: Мир. 1988. – 278 с.
72. Чарный, А.М. Патопфизиология гипоксических состояний // М.: Медгиз. – 1961. – Т. 54. – С. 343.
73. Чеснокова, Н.П. Типовые патологические процессы / Н.П. Чеснокова: Монография // Издательство Саратовского медицинского университета. 2004. - 400 с. - С. 132-136.
74. Шустов, Е.Б. Экс-орфанные рецепторы как мишени для потенциальных лекарственных средств / Е.Б. Шустов, С.В. Оковитый // Биомедицина. – 2015. – №2. – С.15-29.
75. Шустов, Е.Б. Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием / Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семёнов и др. // Биомедицина. –2015. – №1. – С. 18-23
76. Яснецов, В.В. Сравнительное исследование противогипоксического, нейропротекторного и обезболивающего действия сукцинатсодержащих препаратов / В.В. Яснецов, Е.П. Просвинова, Е.Г. Цублова и др. // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2012. – Т.46. – №6. – С. 41-45.
77. Addabbo, F. Mitochondria and reactive oxygen species / F. Addabbo, M. Montagnani, M.S. Goligorsky // Hypertension. – 2009. – Vol. 53. – №6. – P. 885-892.
78. Adibhatla, R.M. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia / R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher // Neurosci Res. – 2003. – Vol. 73. – P.308–315.
79. Adibhatla, R.M. Effect of citicoline on phospholipids and glutathione levels in transient cerebral ischemia / R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher, R.J. Dempsey // Stroke. – 2001. – Vol.32. –P. 2376–2381.

80. Aguiar, C.J. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation / C.J. Aguiar, J.A. Rocha-Franco, P.A. Sousa, A.K. Santos, // *Cell Communication and Signaling*. – 2014. – Vol. 12 – № 1. – P. 78.

81. Akesson, B. Effects of analogues of ethanolamine and choline on phospholipid metabolism in rat hepatocytes / B. Akesson // *Biochemical Journal*. – 1977. – Vol. 168. – №3. – P. 401-408.

82. Alberghina, M. Effect of CDP -choline on the biosynthesis of phospholipids in brain regions during hypoxic treatment / M. Alberghina, M. Viola, I. Serra et al. // *Journal of neuroscience research*. – 1981. – Vol. 6. – №3. – P. 421-433.

83. Altshuler, B. Modeling of dose-response relationships / B. Altshuler // *Environmental health perspectives*. – 1981. – Vol. 42. – P. 23.

84. Alvarez, X.A. Double-Blind Placebo-Controlled Study with Citicoline in APOE Genotyped Alzheimer's Disease Patients. Effects on Cognitive Performance, Brain Bioelectrical Activity and Cerebral / X.A. Alvarez, R. Mouzo, V. Pichel et al. // *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. – 1999. – Vol. 21. – № 9. – P. 633.

85. Alvarez-Sabin, J. Long-term treatment with citicoline may improve post-stroke vascular cognitive impairment / J. Alvarez-Sabin, G. Ortega, C. Jacas et al. // *Cerebrovasc Dis*. –2013. – Vol. –35. – №146. – P.154.

86. Amenta, F. Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches / F. Amenta, L. Parnetti, V. Gallai, A. Wallin // *Mechanisms of ageing and development*. – 2001. – Vol. 122. – №16. – P. 2025-2040.

87. Amenta, F. Cholinergic Neurotransmission in the Hippocampus of Aged Rats: Influence of L - α -Glycerylphosphorylcholine Treatment / F. Amenta, F. Franch, A. Ricci, J. A. Vega, // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1993. – Vol. 695. – №1. – P. 311-313.

88. American Hospital Formulary Service. 1984. Volumes I and II. American Society of Hospital Pharmacists, Washington, D.C. Cited by HSDB – 1996.
89. Ansell, G.B. Studies on the origin of choline in the brain of the rat / G. B. Ansell, S. Spanner // *Biochemical Journal*. – 1971. – Vol. 122. – №5. – P. 741-750.
90. Ansell, G.B. Functional metabolism of brain phospholipids / G. B. Ansell, S. Spanner // *International review of neurobiology*. – 1977. – V. 20. – P. 1-29.
91. Arakawa, S. Neuroprotection in stroke / S. Arakawa, N. Perera, G.A. Donnan // *ACNR*. – 2005. – Vol. 5. – №5. – P. 10-11.
92. Ariza, A.C. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions / A.C. Ariza, P.M.T. Deen, J.H. Robben // *Frontiers in Endocrinology. Molecular and Structural Endocrinology*. – 2012. – V. 3. – P. 1-8.
93. Aronowski, J. Citicoline for treatment of experimental focal ischemia: histologic and behavioral outcome / J. Aronowski, R. Strong, J.C. Grotta // *Neurol Res*. – 1996. – Vol.18. – №6. – P.570-574.
94. Bargiotas, P. Functional outcome of pannexin-deficient mice after cerebral ischemia / P. Bargiotas, A. Krenz, H. Monyer и др. // *Channels*. – 2012. – Vol. 6. – № 6. – P. 453-456.
95. Beers, R.F. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase / R.F. Beers, I.W. Sizer // *Journal of biological chemistry*. – 1952. – Vol. 195. – №1. – P. 133-140.
96. Bertoni-Freddari, C. The effect of acute and chronic centrophenoxine treatment on the synaptic plasticity of old rats / C. Bertoni-Freddari, C. Giuli Pieri // *Archives of gerontology and geriatrics*. – 1982. – Vol. 1. – № 4. – P. 365-373.
97. Blad, C.C. G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets / C.C. Blad, C. Tang, S. Offermanns // *Nature reviews - Drug discovery*. – 2012. – Vol. 11. – P. 603-619.

98. Blin, O. Effects of dimethylaminoethanol pyroglutamate (DMAE p-Glu) against memory deficits induced by scopolamine: evidence from preclinical and clinical studies / O. Blin, C. Audebert, S. Pitel et al. // *Psychopharmacology*. – 2009. – Vol. 207. – №2. – P. 201-212.

99. Boismare, F. Action of cytidine diphosphocholine on functional and hemodynamic effects of cerebral ischemia in cats / F. Boismare, M. Le Poncin-Lafitte, J. Lefrançois et al. // *Pharmacology*. – 1978a. – Vol. 17. – P. 15-20.

100. Boismare, F. Hemodynamic, functional and biochemical effects of hypobaric hypoxia in rats treated with cytidine diphosphocholine / F. Boismare, M. Le Poncin-Lafitte, J.R. Rapin // *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* – 1978b. – Vol. 172. – P. 651.

101. Bowers, M.B. Some behavioral changes in man following anticholinesterases / M. B. Bowers, E. Goodman, V.M. Sim // *Federation proceedings*. – 9650 Rockville pike, Bethesda, Md 20814-3998 : Federation Amer Soc. Exp. Biol. – 1962. – Vol. 21. – №2. – P. 417.

102. Bray, R.C. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide / R.C. Bray, S.A. Cockle, E.M. Fielden et al. // *Biochem. J.* – 1974. – Vol. 139. – №1. – P. 43-48.

103. Bruch, R.C. Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes / R.C. Bruch, W.S. Thayer // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1983. – Vol. 733. – № 2. – P. 216-222.

104. Bruick, R.K. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF / R.K. Bruick, S.L. McKnight // *Science*. – 2001 – Vol .294. – P. 1337-1340.

105. Budd, S.L. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells / S. L. Budd, D. G. Nicholls // *Journal of neurochemistry*. – 1996. – Vol. 67. – №6. – P. 2282-2291.

106. Bustamante, A. Citicoline in pre -clinical animal models of stroke: a meta-analysis shows the optimal neuroprotective profile and the missing steps for

jumping into a stroke clinical trial / A. Bustamante, D. Giralt, L. Garcia-Bonilla et al. // *Journal of neurochemistry*. – 2012. – Vol. 123. – №2. – P. 217-225.

107. Casey, D.E. Mood alterations during deanol therapy / D. E. Casey // *Psychopharmacology*. – 1979. – Vol. 62. – №2. – P. 187-191.

108. Chekeni, F.B. Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis / F. B. Chekeni, M. R. Elliott, J. K. Sandilos et al. // *Nature*. – 2010. – Vol. 467. – № 7317. – P. 863.

109. Chen, H. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate’s protective effect in EAE / H. Chen, J.C. Assmann, A. Krenz, M. Rahman et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2014. – Vol. 124. – №5. P. 2188-2192.

110. Chesnokova, L.S. Quantitative protein analysis, in *Fermenty i nukleinovye kisloty* / L.S. Chesnokova, S.N. Lyzlova, B.G. Vladimirov // *Enzymes and Nucleic Acids* // Eds., St. Petersburg: S.-Peterb. Gos. Univ., –1997.

111. Cho, H.J. Efficacy and safety of oral citicoline in acute ischemic stroke: drug surveillance study in 4,191 cases / H. J. Cho, Y. J. Kim // *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. – 2009. – Vol. 31. – №3. – P. 171-176.

112. Choi, D.W. Excitotoxic cell death / D.W. Choi // *Journal of neurobiology*. – 1992. – Vol. 23. – №9. – P. 1261-1276

113. Choi, D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity / D.W. Choi // *Journal of Neuroscience*. – 1987. – Vol. 7. – №2. – P. 369-379.

114. Choi, D.W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death / D.W. Choi // *Trends Neurosci*. 1995. Vol. 18. – №2. –P. 58 – 60.

115. Choi, D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent / D.W. Choi // *Neurosci Lett*. 1985. Vol. 58. – №3. –P. 293 – 297.

116. Choi, J. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson disease / J. Choi, H.D. Rees, S.T. Weintraub et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – №12. – P. 11648–11655.

117. Cimino, M. Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: a comparison between adult and neonatal rat models of cerebral ischemia / M. Cimino, W. Balduini, S. Carloni et al. // *Neurotoxicology*. – 2005. – Vol. 26. – №5. – P. 929-933.
118. Clark, W.M. A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients / W. M. Clark, L. R. Wechsler, L. A. Sabounjian et al. // *Neurology*. – 2001. – Vol. 57. – №9. – P. 1595-1602.
119. Clark, W.M. A randomized dose-response trial of citicoline in acute ischemic stroke patients / W.M., Clark, S.J., Warach, L.C., Pettigrew et al. // *Neurology*. – 1997. – Vol. 49. – №3. – P. 671-678.
120. Clark, W.M. A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke / W. M. Clark, B. J. Williams, K. A. Selzer et al. // *Stroke*. – 1999. – Vol. 30. – №12. – P. 2592-2597.
121. Cohen, E.L. Brain acetylcholine: increase after systematic choline administration / E.L. Cohen, R.J. Wurtman // *Life sciences*. – 1975. – Vol. 16. – №7. – P. 1095-1102.
122. Cornford, E.M. Carrier mediated blood-brain barrier transport of choline and certain choline analogs / E. M. Cornford, L.D. Braun, W.H. Oldendorf // *Journal of neurochemistry*. – 1978. – Vol. 30. – №2. – P. 299-308.
123. Dahlberg, L. Regulation of plasma choline by base exchange / L. Dahlberg, J. Schuberth // *Journal of neurochemistry*. – 1977. – Vol. 29. – №5. – P. 933-934.
124. Dávalos, A. Citicoline preclinical and clinical update 2009–2010 / A. Dávalos, J. Secades // *Stroke*. – 2011. – Vol. 42. – № 1 – P. S36-S39.
125. Dávalos, A. Oral citicoline in acute ischemic stroke / A. Dávalos, J. Castillo, J. Álvarez-Sabín et al. // *Stroke*. – 2002. – Vol. 33. – №12. – P.2850-2857.
126. Dávalos, A. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial) / A.

Dávalos, J. Alvarez-Sabín, J. Castillo et al. // *The Lancet*. – 2012. – Vol. 380. – №9839. – P. 349-357.

127. Davis, K.L. Choline in tardive dyskinesia and Huntington's disease / K. L. Davis, L. E. Hollister, J. D. Barchas et al. // *Life sciences*. – 1976. – Vol. 19. – №10. – P. 1507-1515.

128. De Leciñana, M.A. Effect of combined therapy with thrombolysis and citicoline in a rat model of embolic stroke / M. A. de Leciñana, M. Gutiérrez, J. M. Roda et al. // *Journal of the neurological sciences*. – 2006. – Vol. 247. – №2. – P. 121-129.

129. De Silva, L. Biochemical mechanisms and management of choreiform movement disorders / L. De Silva // *Drugs*. – 1977. – Vol. 14. – №4. – P. 300-310.

130. Deacon, R.M.J. T-maze alternation in the rodent / R.M.J. Deacon, J. N.P. Rawlins // *Nature protocols*. – 2006. – Vol. 1. – №1. – P. 7.

131. Del Zoppo, G.J. Relationship of neurovascular elements to neuron injury during ischemia / G.J. Del Zoppo // *Cerebrovascular diseases*. – 2009. – Vol. 27. – №1. – P. 65-76.

132. Diederich, K. Citicoline enhances neuroregenerative processes after experimental stroke in rats / K. Diederich, K. Frauenknecht, J. Minnerup et al // *Stroke*. – 2012. – Vol. 43. – №7. – P. 1931-1940.

133. D'Orlando, K.J. Citicoline (CDP-choline): mechanisms of action and effects in ischemic brain injury / K.J.D'Orlando, Jr B.W. Sandage // *Neurological research*. – 1995. – Vol. 17. – №4. – P. 281-284.

134. Drachman, D.A. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a special role / D.A. Drachman // *Neurology*. – 1977. – Vol. 27. – P. 783- 790.

135. Drager, L.F. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea / L.F. Drager, J.C. Jun, V.Y. Polotsky // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 24. – P.843–851.

136. Fabian, R.H. Perivascular nitric oxide and superoxide in neonatal cerebral hypoxia-ischemia / R.H. Fabian, J.R. Perez-Polo, T.A. Kent // *American*

Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2008. – Vol. 295. – № 4. – P. 1809-1814.

137. Fan, X. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury / X. Fan, A. Kavelaars, C.J. Heijnen et al. // Curr. Neuropharmacol. – 2010. – Vol. 8. – №4. – P. 324–334.

138. Fernandes, M.A. Divided attention and memory: evidence of substantial interference effects at retrieval and encoding / M.A. Fernandes, M. Moscovitch // J. Exp. Psychol. Gen. – 2000. – Vol. 129. – P. 155-176.

139. Ferraguti, F. Metabotropic glutamate receptors / F. Ferraguti, R. Shigemoto // Cell and tissue research. – 2006. – Vol. 326. – №2. – P. 483-504.

140. Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis / N. Ferrara // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2001. – Vol. 280. – №6. – P. 1358-1366.

141. Fisman, M. Double-blind trial of 2-dimethylaminoethanol in Alzheimer's disease / M. Fisman, H. Merskey, E. Helmes // The American journal of psychiatry. – 1981. – Vol. 138. – №7. – P. 970-972.

142. Flohé, L. Selenoproteins of the glutathione peroxidase family / L. Flohé, R. Brigelius-Flohé // Its Molecular Biology and Role in Human Health. Springer: New York. – 2012. – P.167-180.

143. Freeman J.J. The source of choline for acetylcholine synthesis in brain / J.J. Freeman, D.J. Jenden // Life Sci. – 1976. – Vol. 19. – P. 949-962.

144. Gershon, S. Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides / S. Gershon, F. H. Shaw // The Lancet. – 1961. – Vol. 277. – №7191. – P. 1371-1374.

145. Giuli, C. Morphometric studies on synapses of the cerebellar glomerulus: the effect of centrophenoxine treatment in old rats / C. Giuli, C. Bertoni-Freddari, C. Pieri // Mechanisms of ageing and development. – 1980. – Vol. 14. – №1. – P. 265-271.

146. Golosnaya, G.S. Interaction of neurotrophic and pro-apoptotic factors in the pathogenesis of hypoxic brain injury in newborns / G. S. Golosnaya, A. S.

Petrukhin, T. M. Krasilschikova et al. // *Pediatrics*. – 2010. – Vol. 89. – №1. – P. 20-25.

147. Growdon, J.H. Oral choline administration to patients with tardive dyskinesia / J.H. Growdon, M.J. Hirsch, R.J. Wurtman et al // *New England Journal of Medicine*. – 1977. – Vol. 297. – №10. – P. 524-527.

148. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack. The European Stroke Organization (ESO), 2008. – 120 c.

149. Gutiérrez-Fernández, M. CDP-choline treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke / M. Gutiérrez-Fernández, B. Rodríguez-Frutos, B. Fuentes et al. // *Neurochemistry international*. – 2012. – Vol. 60. – №3. – P. 310-317.

150. Haddad, J.J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox -sensitive transcription factors / J.J. Haddad // *Cellular signalling*. – 2002. – Vol.14. – №11. – P. 879-897.

151. Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) / B.Halliwell // *Free radical research*. – 1999. – Vol. 31. – №4. – P. 261-272.

152. Hamel, D. G-Protein–Coupled Receptor 91 and Succinate Are Key Contributors in Neonatal Postcerebral Hypoxia-Ischemia RecoverySignificance / D. Hamel, M. Sanchez, F. Duhamel et al. // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2014. – Vol. 34. – №2. – P. 285-293.

153. Han, H.S. Mild hypothermia inhibits nuclear factor- κ B translocation in experimental stroke / H. S. Han, M. Karabiyikoglu, S. Kelly et al. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2003. – Vol. 23. – №5. – P. 589-598.

154. Haubrich, D.R. Increase in rat brain acetylcholine induced by choline or deanol / D. R. Haubrich, P. F. Wang, D. E. Clody et al. // *Life sciences*. – 1975. – Vol. 17. – №6. – P. 975-980.

155. Haubrich, D.R. Regulation of acetylcholine synthesis in nervous tissue / D.R. Haubrich, T.J. Chippendale // *Life sciences*. – 1977. – Vol. 20. – №9. – P. 1465-1478.

156. He, W. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors / W.He, F.J.-P. Miao Lin, R.T. Schwandner et al. // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – P.188-193.
157. Herrschaft, H. Die Wirkung von Centrophenoxin auf die regionale Gehirndurchblutung bei Patienten mit zerebrovaskulärer Insuffizienz / H. Herrschaft, F. Gleim, P. Duus // *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. – 1974. – Vol. 99. – №35. – P. 1707-1714.
158. Hodgson, E.K. The interaction of bovine erythrocyte superoxidedismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme / E.K. Hodgson, I. Fridovich // *Biochemistry*. – 1975. – Vol.14. – №24. – P. 5294-5299.
159. Hohl, C. Evidence for succinate production by reduction of fumarate during hypoxia in isolated adult rat heart cells / C. Hohl, R. Oestreich, P. Rose, R. Wiesner, et al. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1987. - Vol. 259. – №2. P. 527-535.
160. Honchar, O.O. Glutathione system adaptation to acute stress in the heart of rats during different regimes of hypoxia training / O.O. Honchar, I.M. Mankovska // *Ukr Biokhim Zh*. – 2007. – Vol. 79. – №3. – P. 79-85.
161. Horrocks, L.A. CDPcholine and CDPethanolamine prevent the release of free fatty acids during brain ischemia / L. A. Horrocks, R. V. Dorman, Z. Dabrowiecki et al. // *Progress in lipid research*. – 1981. – Vol. 20. – P. 531-534.
162. Hurtado, O. Delayed post-ischemic administration of CDP-choline increases EAAT2 association to lipid rafts and affords neuroprotection in experimental stroke / O. Hurtado, J. M. Pradillo, D. Fernandez-Lopez et al. // *Neurobiology of disease*. – 2008. – Vol. 29. – №1. – P. 123-131.
163. Hurtado, O. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain Vschemia: effects on glutamate transport / O. Hurtado, M.A. Moro, A. Cárdenas et al. // *Neurobiology of disease*. – 2005. – Vol. 18. – №2. – P. 336-345.

164. Hurtado, O. Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline / O. Hurtado, I. Lizasoain, M. Á. Moro // *Stroke*. – 2011. – Vol. 42. – №1. – C. S33-S35.

165. Hurtado, O.A. chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke / O. Hurtado, A. Cardenas, J. M. Pradillo et al. // *Neurobiology of disease*. – 2007. – Vol. 26. – №1. – P. 105-111.

166. Illingworth, D.R. The uptake and metabolism of plasma lysophosphatidylcholine in vivo by the brain of squirrel monkeys / D.R. Illingworth, O.W. Portman // *Biochemical Journal*. – 1972. – Vol. 130. – №2. – P. 557-567.

167. Janowsky, D.S. Parasympathetic suppression of manic symptoms by physostigmine / D. Janowsky, J. Davis, M.K. El-Yousef et al. // *Archives of General Psychiatry*. – 1973a. – Vol. 28. – №4. – P. 542-547.

168. Janowsky, D.S. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression / D. Janowsky, J. Davis, M.K. El-Yousef et al. // *The Lancet*. – 1972. – Vol. 300. – №7778. – P. 632-635.

169. Janowsky, D.S. Antagonistic effects of physostigmine and Vmethylphenidate in man / D. Janowsky, J. Davis, M.K. El-Yousef et al // *American Journal of Psychiatry*. – 1973b. – Vol. 130. – №12. – P. 1370-1376.

170. Janssen-Heininger, Y.M.W. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ b / Y.M.W. Janssen-Heininger, M.E. Poynter, P.A. Baeuerle // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2000. – Vol. 28. – №9. – C. 1317-1327.

171. Jellema, R.K. Cerebral inflammation and mobilization of the peripheral immune system following global hypoxia-ischemia in preterm sheep / R.K. Jellema, V.L. Passos, A. Zwanenburg et al. // *Journal of neuroinflammation*. – 2013. – Vol. 10, №1. – P. 807.

172. Jope, R.S. Choline and phospholipid metabolism and the synthesis of acetylcholine in rat brain / R. S. Jope, D. J. Jenden // *Journal of neuroscience research*. – 1979a. – Vol. 4. – №1. – P. 69-82.

173. Jope, R.S. Dimethylaminoethanol (deanol) metabolism in rat brain and its effect on acetylcholine synthesis / R.S. Jope, D.J. Jenden // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1979. – Vol. 211. – №3. – P. 472-479.

174. Jun, J.C., Intermittent hypoxia-induced glucose intolerance is abolished by alpha-adrenergic blockade or adrenal medullectomy / J. C. Jun, M. K. Shin, R. Devera et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2014. – Vol. 307. – P.1073–1083.

175. Kakihana, M. Effects of CDP-choline on neurologic deficits and cerebral glucose metabolism in a rat model of cerebral ischemia / M. Kakihana, N. Fukuda, M. Suno, A. Nagaoka // *Stroke*. – 1988. – Vol. 19. – №2. – P. 217-222.

176. Kapoor, V.K. Synthetic drugs with anti-ageing effects / V. K. Kapoor, J. Dureja, R. Chadha // *Drug discovery today*. – 2009. – Vol. 14. – №17. – P. 899-904.

177. Karen, E. Toxicological Summary for Dimethylethanolamine and Selected Salts and Esters / E. Karen, S. Masten, P.O. Box // *Review of toxicological literature*. – 2012. – P.131.

178. Keil, U. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress / U. Keil, I. Scherping, S. Hauptmann, K. Schuessel et al. // *British journal of pharmacology*. – 2006. – Vol. 147. – №2. – P. 199-208.

179. Khodorov, B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons / B. Khodorov // *Progress in biophysics and molecular biology*. – 2004. – Vol. 86. – №2. – P. 279-351.

180. Khoury, N. Reduction in insulin sensitivity following administration of the clinically used low-dose pressor, norepinephrine / N. Khoury, J.B. McGill // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2011. – Vol. 27. – P. 604–608.

181. Komaromy-Hiller, G. Serum succinate by capillary zone electrophoresis: marker candidate for hypoxia / G. Komaromy-Hiller, P. Sundquist, L. Jacobsen, K. Nuttall // *Ann. Clin. Lab. Sci.* –1997. – Vol. 27. – №2. – P. 163-168.
182. Kostopoulos, G.K. The effects of dimethylaminoethanol (deanol) on cerebral cortical neurons / G.K. Kostopoulos, J.W. Phillis // *Psychopharmacology communications.* – 1975. – Vol. 1. – №3. – P. 339-347.
183. Lee, H.J. Citicoline protects against cognitive impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion / H.J. Lee, J.S. Kang, Y.I. Kim // *J Clin Neurol.* – 2009. – Vol. 5. – №1 – P.33–38.
184. Leonardo, C.C. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury / C. C. Leonardo, K. R. Pennypacker // *Journal of neuroinflammation.* – 2009. – Vol. 6. – №1. – P. 13.
185. Levin, E.D. Effects of nicotinic dimethylaminoethyl esters on working memory performance of rats in the radial-arm maze / E. D. Levin, J. E. Rose, L. Aboud // *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* – 1995. – Vol. 51. – №2. – P. 369-373.
186. Lie, D.C. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis / D. C. Lie, S. A. Colamarino, H. J. Song et al. // *Nature.* – 2005. – Vol. 437. – №7063. – P. 1370-1375.
187. Lukyanova, L.D. Mitochondria-controlled signalling mechanisms of brain protection in hypoxia / L.D. Lukyanova, Y.I. Kirova // *Frontiers in Neuroscience.* – 2015. – Vol. 9. – P. 1-13
188. Maas, J.W. Biogenic amines and depression: Biochemical and pharmacological separation of two types of depression / J.W. Maas // *Archives of General Psychiatry.* – 1975. – Vol. 32. – №11. – P. 1357-1361.
189. Maiti, P. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain / P. Maiti, B. Singh, A.K. Sharma et al. // *Neurochem Int.* – 2006. – Vol. 49. – №8. – P. 709-716.

190. Malanga, G. New insights on dimethylaminoethanol (DMAE) features as a free radical scavenger / G. Malanga, M. Belen Aguiar, H.D Martinez et al. // Drug metabolism letters. – 2012. – Vol. 6. – №1. – P. 54-59.
191. Martin-Arenas, F.J. Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice / F.J. Martin-Arenas, C.O. Pintado // Measuring Behavior 2014.
192. Maxwell, P.H. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia inducible factors for oxygen-dependent proteolysis / P.H. Maxwell, M.S. Wiesener, G.W. Chang et al. // Nature – 1999 - P.271–275
193. Merante, F. The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension / F. Merante, S. M. Altamentova, D. A. Mickle et al. // Molecular and cellular biochemistry. – 2002. – Vol. 229. – №.1-2. – P. 73-83.
194. Miyazaki, I. China's examination hell: The civil service examinations of imperial China / I. Miyazaki // Yale University Press, 1976.
195. Moffett, J.R. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology / J. R. Moffett, B. Ross, P. Arun et al. // Progress in neurobiology. – 2007. – Vol. 81. – №2. – P. 89-131.
196. Monzani, D. Stimulation of the cholinergic neurotransmissions enhances the efficacy of vestibular rehabilitation / D. Monzani, E. Genovese, A. Marrara // Acta Otorhinolaryngol Ital. – 2010. – Vol. 30. – №1. – P.11—19.
197. Moreno, M.D.J.M. Cognitive improvement in mild to moderate Alzheimer's dementia after treatment with the acetylcholine precursor choline alfoscerate: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial / M.D.J. M. Moreno // Clinical therapeutics. – 2003. – Vol. 25. – №1. – P. 178-193.
198. Morgan, B.J. Vascular consequences of intermittent hypoxia / B. J. Morgan // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol. 618. – P.69–84.
199. Morgun, A.V. Current concepts of perinatal ischemic injury in the brain neurovascular unit: molecular targets for neuroprotection / A.V. Morgun,

N.V. Kuvacheva, T.E. Taranushenko, E.D. Khilazheva // Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk. – 2013. – №12. – P. 26-35.

200. Morton, C.C. A mechanism for suppression of the CDP-choline pathway during apoptosis / C.C. Morton, A.J. Aitchison, K. Gehrig et al. // Journal of lipid research. – 2013. – Vol. 54. – №12. – P. 3373-3384.

201. Murphree, H. The stimulant effect of 2-dimethylaminoethanol (deanol) in human volunteer subjects / H. Murphree, C. Pfeiffer, C. Backerman // Clin. Pharmacol. – 1960. – Vol. 1. – P. 303-310.

202. Myllyharju, J. Prolyl 4 -hydroxylases, master regulators of the hypoxia response / J. Myllyharju // Acta Physiologica. – 2013. – Vol. 208. – №2. – P. 148-165.

203. Nagaoka, A. Effects of CDP-choline on neurological deficits in stroke-prone spontaneously hypertensive rats with experimental cerebral ischemia / A. Nagaoka // Jpn/ Pharmacol/ Ther. – 1985. – Vol. 13. – №9. – P. 2229-234.

204. Nagy, I.Z. Age-dependent decrease of the lateral diffusion constant of proteins in the plasma membrane of hepatocytes as revealed by fluorescence recovery after photobleaching in tissue smears / I.Z. Nagy, K. Kitani, M. Ohta et al. // Archives of gerontology and geriatrics. – 1986. – Vol. 5. – №2. – P. 131-146.

205. Nagy, I.Z. The biological waste product formation in the light of the membrane hypothesis of aging / I. Z. Nagy // Archives of gerontology and geriatrics. – 2002. – Vol. 34. – №3. – C. 329-341.

206. Nakanishi, M. Prostaglandin E2 stimulates the production of vascular endothelial growth factor through the E-prostanoid-2 receptor in cultured human lung fibroblasts / M. Nakanishi, T. Sato, Y. Li et al. // Am. J. Respir .Cell Mol. Biol. – 2012. – Vol. 46. – №2. – P. 217-223.

207. Oettinger, L. The use of Deanol in the treatment of disorders of behavior in children / L. Oettinger // The Journal of pediatrics. – 1958. – Vol. 53. – №6. – P. 671-675.

208. Önal, M.Z. Synergistic effects of citicoline and MK-801 in temporary experimental focal ischemia in rats / M.Z. Önal, F. Li, T. Tatlisumak et al. // *Stroke*. – 1997. – Vol. 28. – №5. – P. 1060-1065.

209. Papazisis, G. Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia–ischemia / G. Papazisis, C. Pourzitaki, C. Sardeli et al. // *Pharmacological research*. – 2008. – Vol. 57. – №1. – P. 73-78.

210. Pedata, F. Effect of nootropic agents on brain cholinergic mechanisms / F. Pedata, F. Moroni, G.C. Pepeu // *Clin. Neuropharmacology*. – 1984. – Vol. 7. – P. 772.

211. Pigeolet, E. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals / E. Pigeolet, P. Corbisier, A. Houbion et al. // *Mechanisms of ageing and development*. – 1990. – Vol. 51. – №3. – P. 283-297.

212. Peltonen, G.L. Sympathetic inhibition attenuates hypoxia induced insulin resistance in healthy adult humans / G. L. Peltonen, R. L. Scalzo, M. M. Schweder et al. // *J. Physiol*. – 2012. – Vol. 590. – P. 2801–2809.

213. Peti-Peterdi, J. High glucose and renin release: the role of succinate and SUCNR1 / J. Peti-Peterdi // *Kidney Int.*, 2010. – Vol. 78. – №12. – P. 1214-1217.

214. Peti-Peterdi, J. Mitochondrial TCA cycle intermediates regulate body fluid and acid-base balance / J. Peti-Peterdi // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123. – №7. – P. 2788–2790.

215. Pieralisi, G. Effects of a standardized ginseng extract combined with dimethylaminoethanol bitartrate, vitamins, minerals, and trace elements on physical performance during exercise / G. Pieralisi, P. Ripari, L. Vecchiet // *Clinical therapeutics*. – 1990. – Vol. 13. – №3. – P. 373-382.

216. Pilch, H. Piracetam elevates muscarinic cholinoreceptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice / H. Pilch, W.F. Muller // *Psychopharmacology*. – 1988. – Vol. 94. – P. 74–48.

217. Pomeroy, A.R. Cholinomimetic activity of dimethylamino-ethanol, and-propanol and related compounds / A.R. Pomeroy, C. Raper // *European journal of pharmacology*. – 1972. – Vol. 17. – №1. – P. 81-86.
218. Qingdong, K. Hypoxia-Inducible Factor-1 / K. Qingdong, M. Costa // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 70. – №5. – P.1469–1480.
219. Rao, A.M. CDP-choline: neuroprotection in transient forebrain ischemia of gerbils / A.M. Rao, J.F. Hatcher, R.J. Dempsey // *Journal of neuroscience research*. – 1999. – Vol. 58. – №5. – P. 697-705.
220. Rasmusson, D.D. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity / D.D. Rasmusson // *Behav. Brain Res.* – 2000. – Vol.115. – P. 205-218.
221. Razygraev, A.V. Monoamine oxidase activity in the rat pineal gland: Comparison with brain areas and alteration during aging / A.V. Razygraev, K.I. Taborskaya, K.Y. Volovik et al. // *Advances in Gerontology*. – 2016. – Vol.6. – №2. – P. 111-116.
222. Rijsewijk, F. The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless / F. Rijsewijk, M. Schuermann, E. Wagenaar et al. // *Cell*. – 1987. – Vol. 50. – №4. –P. 649-657.
223. Robben, J.H. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells / J.H. Robben, R.A. Fenton, S.L. Vargas, H. Schweer // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 76. – №12. – P. 1258–1267.
224. Rosell, A. Factors secreted by endothelial progenitor cells enhance neurorepair responses after cerebral ischemia in mice / A. Rosell, A. Morancho, M. Navarro-Sobrino et al. // *PLoS One*. – 2013. –Vol. 8. – №9. –P. e73244.
225. Rowntree, D.W. The effects of diisopropylfluorophosphate in schizophrenia and manic depressive psychosis / D. W. Rowntree, S. Nevin, A. Wilson // *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. – 1950. – Vol. 13. – №1. – P. 47-62.
226. Sadagopan, N. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease / N. Sadagopan, W. Li, S.L. Roberds, et al. // *Am. J. Hypertens.* – 2007. – Vol. 20. – №11. – P. 1209–1215.

227. Safer, D.J. The centrale ffects of scopolamine in man / D.J. Safer, R.P. Allen // *Biological psychiatry*. – 1971. – P. 347-355.
228. Salmina, A.B. NAD⁺-dependent mechanisms of disturbances of viability of brain cells during the acute period of hypoxic-ischemic perinatal injury / O.S. Okuneva, T.E. Taranushenko, A.A. Fursov et al. // *Neurochemical Journal*. – 2008. – Vol. 2. – №3. – P. 215-221.
229. Salmina, A.B. NAD⁺ metabolism and ADP-ribosyl cyclase as targets for central nervous system therapy / A.B. Salmina, R.Y. Olovyanikova, M. Noda et al. // *Current Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 6. – P. 193-210.
230. Salmina, A.B. Neuron-glia interactions as therapeutic targets in neurodegeneration / A.B. Salmina // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2009. – Vol. 16. – №3. – P. 485-502.
231. Sarter, M. Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection / M. Sarter, M.E. Hasselmo, J.P. Bruno et al. // *Brain Res. Rev.* – 2005. – Vol. 48. – P. 98-111.
232. Schabitz, W.R. The effects of prolonged treatment with citicoline in temporary experimental focal ischemia / W.R. Schabitz, J. Weber K. Takano et al. // *J. Neurol. Sci.* – 1996. – Vol.138. – P. 21–25.
233. Schmidt, H. Erfahrungen bei der Behandlung von Zuständen zerebraler Insuffizienz mit centrophenoxin (Helfergin) / H. Schmidt, H. Broicher *Klinische // Medsche Welt*. – 1970. – Vol. 33. – P. 1432-1436.
234. Schramm, M. Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate / M. Schramm, S. Eimerl, E. Costa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1990. – Vol.87. – №3. – P.1193-1197
235. Secades, J.J. Citicoline in intracerebral haemorrhage: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre pilot study / J. J. Secades, J.Dlvarez-Sabín, F. Rubio et al. // *Cerebrovascular Diseases*. – 2006. – Vol. 21. – №5. – P. 380-385.

236. Semenov, D. Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: involvement of NMDA receptors / D. Semenov, M. Samoilov, J. Lazarewicz // *Neurosignals*. – 2002. – Vol.11, – №6. – P.329-335.
237. Semenza, G.L. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1 / G. L. Semenza // *Bioch. Pharmacol.* – 2002 – Vol.64 – P.993-998.
238. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis / G.L. Semenza // *Bioch. Pharmacol.* – 1998 – Vol. 8. – №5. – P. 588-594.
239. Semenza, G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Semenza // *Physiology*. – 2009. – Vol. 24. – №2. – P. 97-106.
240. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 α cancer therapy / G.L. Semenza // *Cancer. Nature Reviews Cancer* – 2003 – Vol.3. – P. 721-732.
241. Semenza, G.L. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level / G.L. Semenza // *Physiology (Bethesda)*. – 2004. – Vol.19. – P.176-182.
242. Semenza, G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site 96 required for transcriptional activation / G.L. Semenza, G.L. Wang // *Mol. Cell Biol.* – 1992. – Vol.12. – P.5447- 5454.
243. Sandoel, A. HIF -1 antagonizes p53 mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase / A. Sandoel, I. Kohler, C. Fellmann et al. // *Nature*. – 2010. – Vol. 465. – P. 577–583.
244. Shi, H. Hypoxia inducible factor 1 as a therapeutic target in ischemic stroke / H. Shi // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 16. – №34. – P. 4593-4600.
245. Shimada, I.S. Proliferating reactive astrocytes are regulated by Notch-1 in the peri-infarct area after stroke / I.S. Shimada, A. Borders, A. Aronshtam, et al. // *Stroke*. – 2011. – Vol. 42. – №11. – P. 3231–3237

246. Shin, M.K. Carotid body denervation prevents fasting hyperglycemia during chronic intermittent hypoxia / M.K. Shin, Q. Yao, J. C. Jun et al. / J. Appl. Physiol. – 2014. – Vol. 117. – P. 765–776.

247. Shuaib, A. Evaluating the efficacy of citicoline in embolic ischemic stroke in rats: neuroprotective effects when used alone or in combination with urokinas / A. Shuaib, Y. Yang, Q. Li // Experimental neurology. – 2000. – Vol. 161. – №2. – P. 733-739.

248. Simpson, E.J. PlanHab: the combined and separate effects of 16 days of bed rest and normobaric hypoxic confinement on circulating lipids and indices of insulin sensitivity in healthy men / E. J. Simpson, T. Debevec, O. Eiken et al. // J. Appl. Physiol. – 2016. Vol. 120. – P. 947–955.

249. Stenbäck, F. Effect of lifetime, administration of dimethylaminoethanol on longevity, aging changes, and cryptogenic neoplasms in C3H mice / F. Stenbäck, J. H. Weisburger, G. M. Williams // Mechanisms of ageing and development. – 1988. – Vol. 42. – №2. – P. 129-138.

250. Stout, A.K. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake / A. K. Stout, H. M. Raphael, B. I. Kanterewicz et al. // Nature neuroscience. – 1998. – Vol. 1. – №5. – P. 366-373.

251. Taegtmeyer, H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles / H. Taegtmeyer // Circ. Res. – 1978. – Vol. 43. – №5. – P. 808-815.

252. Takasaki, K. Neuroprotective effects of citidine-5-diphosphocholine on impaired spatial memory in a rat model of cerebrovascular dementia / K. Takasaki, K. Uchida, R. Fujikawa et al. // Journal of pharmacological sciences. – 2011. – Vol. 116. – №2. – P. 232-237.

253. Takanashi, Y. Relationship between hyperglycemia following head injury and neurological outcome / Y. Takanashi, M. Shinonaga, F. Nakajama //Shinkei. – 2001. – Vol. 53. – №1. – P. 61-64.

254. Tammenmaa, I. Cholinergic medication for neuroleptic-induced tardive dyskinesia / I. Tammenmaa, J. McGrath, E. E Sailas et al. // The Cochrane Library. – 2002. – P. 47.

255. Tamminga, C. Depression associated with oral choline / C. Tamminga, R. Smith, S. Chang et al. // The Lancet. – 1976. – Vol. 308. – №7991. – P. 905.

256. Tandogan, B. Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase / B. Tandogan, N. N. Ulusu // FABAD J pharm sci. – 2006. – Vol. 31. – P. 230-237.

257. Tarsy, D. Deanol acetamidobenzoate treatment in choreiform movement disorders / D. Tarsy, M. Bralower // Archives of neurology. – 1977. – Vol. 34. – №12. – P. 756-758.

258. Tazaki, Y. Treatment of acute cerebral infarction with a choline precursor in a multicenter double-blind placebo-controlled study / Y. Tazaki, F. Sakai, E. Otomo et al. // Stroke. – 1988. – Vol. 19. – №2. – P. 211-216.

259. Toma, I. Succinate receptor SUCNR1 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney / I. Toma, J.J. Kang, A. Sipos et al. // The Journal of Clinical Investigation – 2008. - Vol. 118. – №7. – P. 2526-2534.

260. Tonack, S. Endogenous metabolites as ligands for G protein-coupled receptors modulating risk factors for metabolic and cardiovascular disease / S. Tonack, C. Tang, S. Offermanns // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2013. Vol. 304. – P. H501–H513.

261. Tornos, M.E. Pharmacological study of CDP-choline. Protection against toxicity in a model of experimental hypoxia / M. E. Tornos, A. Sacristán, J. A. Ortiz // Arzneimittel-Forschung. – 1983. – Vol. 33. – №7A. – P. 1022-1024.

262. Vergun, O. Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture / O. Vergun, A. I. Sobolevsky, M. V. Yelshansky et al. // The Journal of physiology. – 2001. – Vol. 531. – №1. – P. 147-163.

263. Vojtechovsky, M. The influence of centrophenoxine (lucidril) on learning and memory in alcoholics / M. Vojtechovsky, B. Soukupova, V. Safratova et al. // *International Journal of Psychobiology*. – 1969. – Vol. 11. – №3. – P.193-201
264. Walf, A.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents / A. A. Walf, C. A. Frye // *Nature protocols*. – 2007. – Vol. 2. – №2. – P. 322-328.
265. Warburton, E.C. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory / E.C. Warburton, T. Koder, K. Cho // *Neuron*. – 2003. – Vol.38. – P. 987-96.
266. Weiner, W.J. The effect of dimethylaminoethanol (DEANOL) on amphetamine-induced stereotyped behavior (AISB) / W. J. Weiner, D. J. Kanapa, H. L. Klawans // *Life sciences*. – 1976. – Vol. 19. – №9. – P. 1371-1376.
267. Wiesner, R.J. Pathways of succinate formation and their contribution to improvement of cardiac function in the hypoxic rat heart / R.J. Wiesner, P. Rosen, M.K. Grieshaber // *Biochem. Med. Metab. Biol.* – 1988. – Vol. 40. – №1. – P. 19–34.
268. Winerdal, M. Long lasting local and systemic inflammation after cerebral hypoxic ischemia in newborn mice / M. Winerdal, J. Kinn, V. Urmaliya et al. // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – №5. – P. e36422.
269. Xin, X. Targeting COX-2 and EP4 to control tumor growth, angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis to the lungs and lymph nodes in a breast cancer model / X. Xin, M. Majumder, G.V. Girish et al. // *Lab/ Invest*. – 2012. – Vol. 92. – №8. – P. 1115–1128.
270. Yanni, S.E. The role of PGE2 receptor EP4 in pathologic ocular angiogenesis / S.E. Yanni, J.M. Barnett, M.L. Clark J.S. Penn // *Invest Ophthalmol. Vis. Sci*. – 2009. – Vol. 50. – №11. – P. 5479–5486.
271. Yenari, M. A. Microglia potentiate damage to blood–brain barrier constituents / M. A. Yenari, L. Xu, X. N. Tang et al. // *Stroke*. – 2006. – Vol. 37. – №4. – P. 1087-1093.

272. Yi, C.X. The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism / C. X. Yi, S. E. la Fleur, E. Fliers et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – P.416–431.

273. Yoon, S.J. Neurochemical alterations in methamphetamine-dependent patients treated with cytidine-5'-diphosphate choline: a longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy study / S. J. Yoon, I. K. Lyoo, H. J. Kim et al. // *Neuropsychopharmacology*. – 2010. – Vol. 35. – №5. – P. 1165-1173.

274. Zagorska, A. HIF-1: knowns and unknowns of hypoxia sensing / A. Zagorska, J. Dulak // *Acta Biochimica Polonica*. – 2004. – Vol. 51. – №3. – P. 563–585.

275. Zen, A.A.H. Notch signalling in ischaemia-induced angiogenesis / A.A.H. Zen, P. Madeddu // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – Vol.37. – №6. – P.1221-1227.

276. Zhang, Y. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cgamma pathway / Y. Zhang, Y. Daaka // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – №19. – P. 5355–5364.

277. Ziemka-Nalecz, M. Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, exhibits neuroprotective neurogenic effects in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia / M. Ziemka-Nalecz, J. Jaworska, J. Sypecka et al. // *Molecular neurobiology*. – 2017. – Vol. 54. – №7. – P. 5300-5318.