

На правах рукописи

Хури Елена Игоревна

Изучение церебропротекторной активности производных пиримидин-4-1(Н) -она при
черепно-мозговой травме у экспериментальных животных

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени

кандидата фармацевтических наук

Волгоград – 2020

Работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте –филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор

Воронков Андрей Владиславович

Официальные оппоненты:

Каленикова Елена Игоревна – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Оковитый Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в __ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов,1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих причин смертности и, прежде всего, инвалидизации населения [Hyder A.A., 2007]. В Российской Федерации отмечается свыше 600 тыс. случаев ЧМТ, при этом 70-90% приходится на травму легкой, либо средней тяжести [Levin H.S., 2015]. Ежегодно в общемировых масштабах регистрируется более 13 млн. новых случаев отсроченной инвалидности после перенесенной черепно-мозговой травмы [MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 2013], при этом лица, у которых отмечаются посттравматические расстройства, подвержены социальной дезадаптации и требуют специализированного ухода, что негативно сказывается на экономической эффективности системы здравоохранения и влечет за собой увеличение прямых и косвенных затрат на поддержание должного уровня качества жизни пациентов, перенесших травму мозга [Roosenbeek B., 2013]. В связи со значительной медико-социально-экономической ролью черепно-мозгового травматизма, совершенствование и разработка новых путей коррекции данного патологического состояния представляет несомненный научно-практический интерес.

Степень разработанности темы

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в лечении ЧМТ, список эффективных, безопасных и экономически выгодных препаратов ограничен, в связи с чем продолжаются научные изыскания в области поиска и создания препаратов-церебропротекторов для терапии черепно-мозгового травматизма [Новиков В.Е., 2003]. По литературным данным, особый интерес представляют собой производные пиримидина, которым присущ широкий спектр фармакологической активности, включающий в себя противовирусное [Meneghesso S, 2012], антимикробное [Anurama B, 2012], противовоспалительное [Сочнев В. С., 2015], анальгетическое [Ashour НМ, 2013], антиоксидантное действие [Bhalgat СМ, 2014]. При этом некоторые виды фармакологического действия могут лежать в основе церебропротекторных свойств (антиоксидантное, противовоспалительное действие). Таким образом, представляется перспективным поиск среди производных пиримидина фармакологически активных веществ, способных оказать цереброзащитное действие в условиях черепно-мозговой травмы.

Цель исследования

Изучить церебропротекторные свойства производных пиримидин-4-1(Н) - она в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

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

Научная новизна исследования

В рамках данного исследования впервые экспериментально обоснована возможность применения производного пиримидин-4-1(Н) – она под лабораторным шифром PDMGLY для терапии черепно-мозговой травмы. Впервые для соединения PDMGLY определены параметры «острой» токсичности, установлена оптимальная доза соединения-лидера. Впервые для соединения PDMGLY изучены церебропротекторные свойства, проанализировано влияние данного соединения на процессы деструкции мозговой ткани, поведенческую активность, когнитивные функции и развитие неврологического дефицита у животных в условиях черепно-мозговой травмы. Оценено влияние соединения-лидера на эндотелиальную функцию, активность про/антиоксидантной системы и интенсивность апоптотических процессов в ткани головного мозга в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы.

Методология исследования

В диссертационном исследовании использовался комплексный подход к оценке церебропротекторной активности изучаемых соединений. Ход исследования соответствовал этическим нормам работы с экспериментальными животными.

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

Научно-практическая ценность и реализация результатов работы

Результаты экспериментальной работы представляются актуальными для химиков-синтетиков при целенаправленном поиске и синтезе в ряду производных пиримидина новых соединений для коррекции церебральных нарушений различного генеза. Полученные в работе результаты, используются в учебном процессе на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ - филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ, а также на кафедре органической химии ПМФИ - филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ.

Положения, выносимые на защиту

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

2. Соединение PDMGLY в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы оказывает церебропротекторное действие, выражаемое в улучшении поведенческих и когнитивных функций у животных, снижении отека, неврологического дефицита и деструкции мозговой ткани и восстановлении биоэлектрической активности головного мозга, превосходя по активности препарат сравнения - холина альфосцерат.

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

Личный вклад автора

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

Объем и структура диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен **обзор литературы**, в котором отражены эпидемиологические и социально-экономические аспекты черепно-мозгового травматизма, а также основные патогенетические механизмы, которые включают в себя первичное и вторичное повреждение мозговой ткани. Кроме того, представлены основные группы препаратов, применяемые для фармакокоррекции травматического повреждения головного мозга.

В **главе 2** отражены материалы и методы исследования, использованные при выполнении диссертационной работы.

Исследование выполнено на 250 мышах-самцах линии Balb/c и 430 крысах - самцах линии Wistar. Экспериментальные животные были получены из лаборатории живых систем Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ. Все эксперименты были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол № 2090-2016 от 23 декабря 2016 года. Эвтаназию животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997).

В работе изучена церебропротекторная активность ряда производных пиримидин-4-1(Н)-она (5 соединений), синтезированных на кафедре органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ МЗ РФ. В каждом блоке исследований формировались группы интактных животных (ИЖ) - первая группа; животных негативного контроля (НК) – вторая группа, у которых моделировали ЧМТ методом свободного падения груза, остальные группы были представлены животными, получавшими исследуемые субстанции в дозе 50 мг/кг

(Воронков А.В., 2016) и референтный препарат - холина альфосцерат в дозе 50 мг/кг [Guseva M.V., et.al., 2008].

На первом этапе исследования проводили оценку «острой» токсичности изучаемых соединений на мышах-самцах линии Balb/c массой 20-22 г, в диапазоне доз 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 2500 мг/кг, 5000 мг/кг и 10000 мг/кг.

Также в данном блоке посредством оценки влияния на изменение неврологического, сенсомоторного дефицита, а также линейную скорость мозгового кровотока был осуществлен фармакологический скрининг, где в качестве биологической модели использовали крыс-самцов линии Wistar, массой 200-220г. Все изучаемые объекты и препарат сравнения вводили внутривентрикулярно на протяжении 3-х суток после моделирования экспериментальной ЧМТ. По результатам проведенного исследования было выбрано «соединение-лидер» для дальнейшего изучения - PDMGLY. Далее оценивали зависимость «доза-эффект» соединения-лидера в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг и 150 мг/кг.

В третьем блоке исследования оценивали ноотропную активность и влияние соединения-лидера на психо-эмоциональный статус животных.

На четвертом этапе работы проводили углубленное изучение церебропротекторного действия соединения-лидера.

В пятом блоке были оценены потенциально возможные механизмы действия выбранного нами производного пиримидина.

Церебропротекторную активность производных пиримидина на этапе скрининга выявляли путем влияния веществ на неврологический статус [McGrow CP, 1976; Ганнушкина И.В.,2000], сенсомоторный дефицит (тест «Сужающаяся дорожка» [Schallert T., 2002; Силачев Д.Н., 2013]) и линейную скорость мозгового кровотока, при оценке зависимости «доза-эффект» определяли уровень потребления глюкозы головным мозгом, содержание лактата и белка S100 β определяли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов производства компании Cloud Clone Corp.(США).

Когнитивные нарушения и оценку психо-эмоционального статуса (тесты «УРПИ» [Воронина Т.А., 2000; Sestakova N., 2013], «ТЭИ» [Бондаренко Н.А., 1990; Bondarenko N.A., 2017], «Открытое поле» [Буреш Я.,1991; Воронина Т.А.,2000] и «Приподнятый крестообразный лабиринт»[Sestakova N., 2013; Walf A.A., 2007]). При углубленном изучении соединения-лидера церебропротекторные свойства оценивали по изменению неврологического дефицита (шкала mNSS[Liu W., 2018]), влиянию на биоэлектрическую активность нейронов [Leemburg S., 2018], степень отека [Hayashi T., 2001], проницаемости

гемато-энцефалического барьера [Manaenko A., 2010], активность лактатдегидрогеназы, креатинфосфокиназы, концентрации GFAP, NSE.

Оценивая потенциально возможные механизмы действия соединения-лидера, нами было изучено влияние на *вазодилатирующую функцию* сосудистого эндотелия, которую определяли по изменению скорости церебрального кровотока в условиях введения модификаторов синтеза NO. В качестве таковых использовали: ацетилхолин (АЦХ) 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich), L-аргинин 150 мг/кг (Panreac), нитро-L—аргинин метиловый эфир (L - NAME) 15 мг/кг (Sigma-Aldrich). Эндотелий-независимую вазодилатацию оценивали по реакции сосудов на введение нитроглицерина (НТГ, Биомед, Россия) 0,007 мг/кг. *Антитромботическую функцию* эндотелия сосудов оценивали по изменению степени и скорости агрегации тромбоцитов. Анализ производили на двухканальном лазерном агрегометре АЛАТ – 2 «БИОЛА» (НПФ «БИОЛА», Россия) по методике G.Worn в модификации Габбасова [Габбасов З.А., 1989] на модели АДФ-индуцированной агрегации.

Учитывая значительный вклад NO-синтазной системы в реализацию эндотелиопротекторных свойств фармакологически активных веществ, нами было оценено влияние соединения-лидера на концентрацию изоферментов синтазы оксида азота (eNOS, iNOS, nNOS)

Состояние *противовоспалительной функции* сосудистого эндотелия оценивали по изменению концентрации С-реактивного белка (наборы реактивов производства компании «Арбис+»).

Кроме того, нами было изучено влияние соединения-лидера на процессы перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты. С этой целью были определены следующие показатели: содержание малонового диальдегида (МДА) [Стальная И.Д., 1977], диеновых конъюгатов (ДК) [Гаврилов В.Б., 1983], активности супероксиддисмутазы (СОД) [Чумаков В.Н., 1977], глутатионпероксидазы (ГП) [Pierce S., 1978], каталазы [Королюк М.А., 1988], глутатионредуктазы [Goldberg D.M., 1983], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [Lohr G.W., 1974]. Концентрацию маркеров *апоптоза* в головном мозге (фактора некроза опухоли (TNF α), апоптоз-индуцирующего фактора (AIF), Jun-N-концевой киназы (JNK) и каспазы-3, а также переносчика глюкозы (GLUT1), определяли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов производства компании Cloud Clone Corp.(США).

Статистическая обработка. Результаты экспериментов обрабатывали методами вариационной статистики с применением возможностей программного комплекса

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение «острой» токсичности изучаемых соединений. Фармакологический скрининг.

При проведении оценки «острой» токсичности изучаемых соединений, значение LD_{50} установить не удалось, т.к. в ходе данного блока исследования гибели животных не наблюдалось и за показатель полумлетальной дозы нами, для проведения дальнейших исследований, было выбрано значение максимально введенной дозы – 10000 мг/кг, а изучаемые производные пиримидин 4-1(Н)-1она можно отнести к «практически не токсичным веществам» (5 класс токсичности по К.К. Сидорову) и 5-му классу опасности по СГС классификации ВОЗ.

Фармакологический скрининг

В ходе проведенного исследования установлено, что на фоне экспериментальной ЧМТ у группы крыс негативного контроля (НК) относительно интактных животных (ИЖ) повышается выраженность неврологических нарушений, сенсомоторного дефицита и снижается уровень линейного кровотока (табл.1).

Введение препарата сравнения позволило уменьшить проявления неврологического и сенсомоторного дефицита, а также способствовало сохранению линейной скорости кровотока по отношению к животным НК (табл.1). При введении субстанций PDMGLY, PDMGG, P217, PDMD и PDMS показатель неврологического дефицита был достоверно ниже животных НК. Стоит отметить, что при применении соединения PDMGLY наблюдалось снижение выраженности сенсомоторного дефицита как по отношению к животным без фармакологической поддержки, так и относительно групп животных, получавших соединения PDMGG, P217, PDMD, PDMS. При анализе влияния исследуемых веществ на скорость мозгового кровотока установлено, что при введении вещества PDMGLY изучаемый показатель статистически не отличался от аналогичного значения группы интактных крыс и был сопоставим с группой животных, получавших глиатилин. Применение соединений PDMD, PDMS, PDMGG и P217 значимого влияния на уровень мозгового кровотока не оказало.

Таблица 1. Показатели неврологического, сенсомоторного дефицита и скорости мозгового кровотока на фоне введения исследуемых соединений и препарата сравнения в условиях экспериментальной ЧМТ.

Группа	Неврологический дефицит, баллы	Сенсомоторный дефицит, %	Скорость мозгового кровотока, см/сек
ИЖ	-	17,8±0,59	4,59±0,17
НК	1,250±0,17 [#]	40,8±2,92 [#]	3,38±0,18 [#]
PDMGLY	0,50±0,18*	21,8±2,86*	4,65±0,16*
PDMGG	0,67±0,16*	28,5±2,17* ^к ▲	3,79±0,18 ^к ▲
P 217	0,58±0,2*	29,9±2,11* ^к ▲	3,74±0,17 ^к ▲
PDMD	0,58±0,15*	29,7±2,12* ^к ▲	3,21±0,16 ^к ▲
PDMS	0,67±0,17*	29,9±2,42* ^к ▲	3,75±0,15 ^к ▲
Глиатилин	0,33±0,21*	18,7±2,21*	4,6±0,14*

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

Таким образом, по совокупности полученных данных, на этапе скринингового исследования в качестве соединения-лидера был выбран объект под лабораторным шифром PDMGLY.

Изучение зависимости «доза-эффект» соединения-лидера – PDMGLY в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы

Введение вещества PDMGLY в дозе 50 мг/кг привело к снижению концентрации лактата на 27 % (p<0,05), увеличению линейной скорости мозгового кровотока на 35 % (p<0,05) относительно крыс НК. Необходимо отметить, что введение изучаемого

соединения в дозах 25 мг/кг, 100 мг/кг и 150 мг/кг, значимого влияния на изучаемые показатели не оказало.

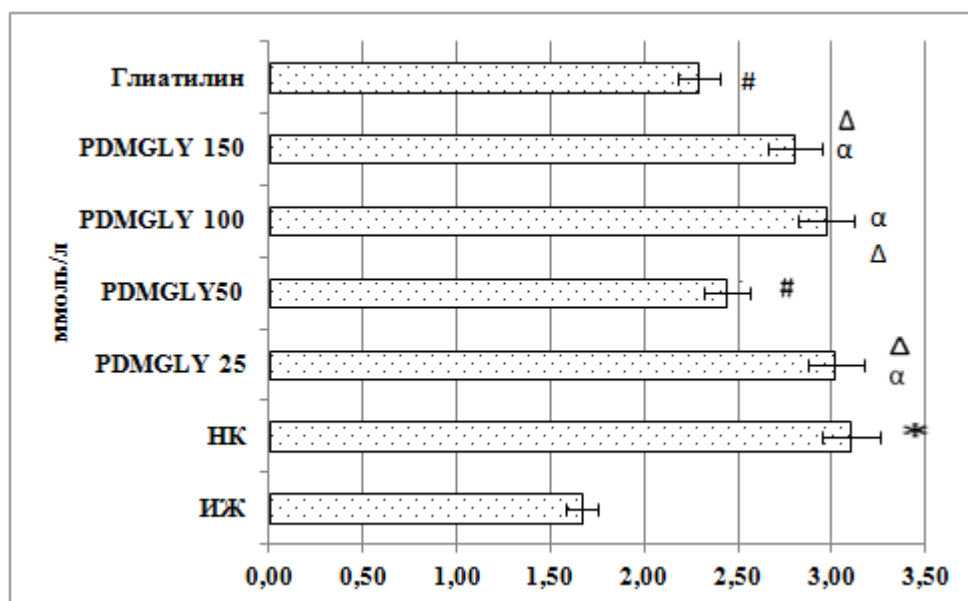


Рисунок 1. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение сывороточной концентрации лактата в условиях экспериментальной ЧМТ

Обозначение: ИЖ – группа интактных животных; НК – группа крыс негативного контроля; PDMGLY25 – группа животных, получавшая соединение PDMGLY в дозе 25 мг/кг; PDMGLY50 – группа животных, получавшая соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг; PDMGLY100 – группа животных, получавшая соединение PDMGLY в дозе 100 мг/кг; PDMGLY150 – группа животных, получавшая соединение PDMGLY в дозе 150 мг/кг; Глиатилин – группа животных, получавшая глиатилин; * - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно ИЖ группы крыс ($p < 0,05$); # - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно НК группы крыс ($p < 0,05$); Δ - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг ($p < 0,05$); α - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших препарат глиатилин в дозе 50 мг/кг ($p < 0,05$)

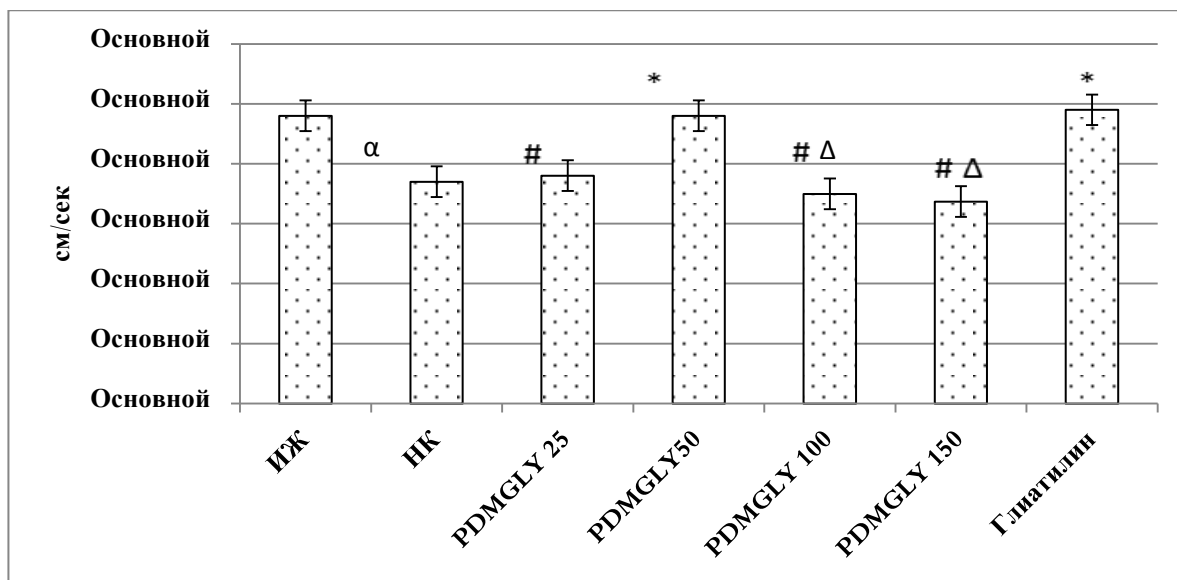


Рисунок 2. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение скорости мозгового у крыс в условиях экспериментальной ЧМТ

Обозначение: α- статистически значимо относительно ИЖ группы животных ($p < 0,05$, критерий Ньюмена-Кейсла); * - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно НК группы крыс ($p < 0,05$); # - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших глиатилин ($p < 0,05$); Δ - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг ($p < 0,05$). Обозначение групп аналогично рисунку 1.

При введении соединения-лидера в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и 150 мг/кг потребление глюкозы головным мозгом крыс было выше на 60,6% ($p < 0,05$); 57,8% ($p < 0,05$) и 44,3% ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы животных НК (рис.3).

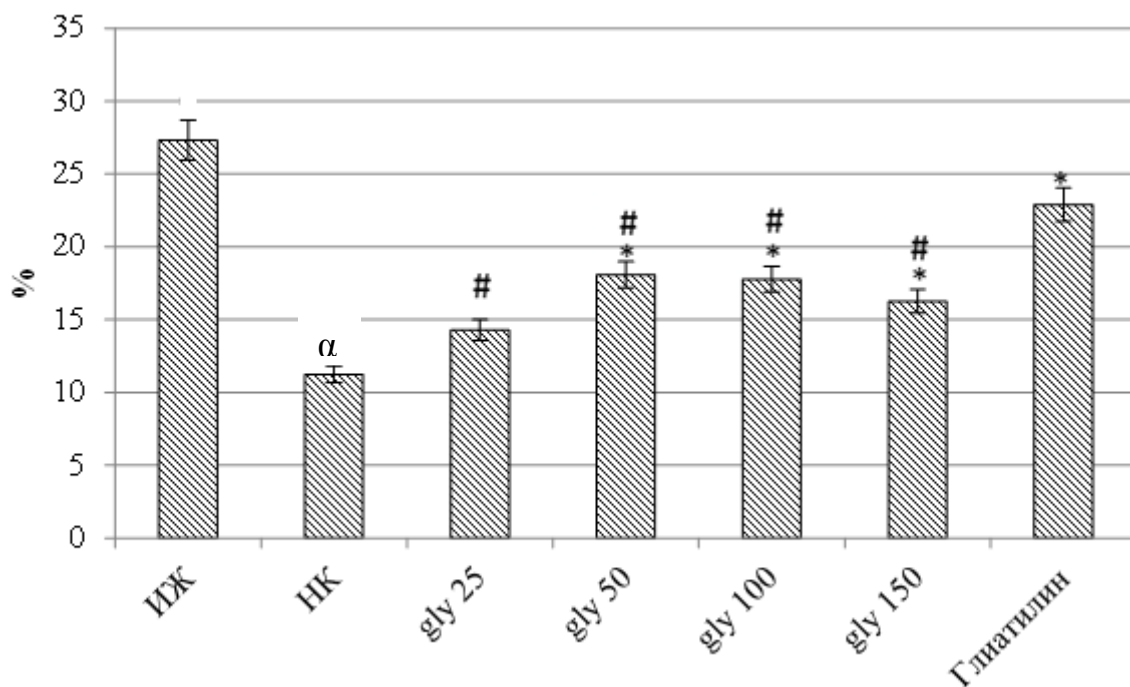


Рисунок 3. Влияние различных доз соединения-лидера на изменение уровня потребления глюкозы головным мозгом в условиях экспериментальной ЧМТ

Обозначение: α - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно ИЖ группы крыс ($p < 0,05$); * - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно НК группы крыс ($p < 0,05$); # - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших глиатилин ($p < 0,05$). Обозначение групп аналогично рисунку 1.

При изучении изменения концентрации цереброспецифического протеина S100 β установлено, что на фоне введения соединения-лидера в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг и 150 мг/кг его содержание было ниже по отношению к группе крыс НК в 2,63 ($p < 0,05$) раза; 2,65 ($p < 0,05$) раза, в 1,81 ($p < 0,05$) раза и в 1,75 ($p < 0,05$) раза соответственно (рис.4).

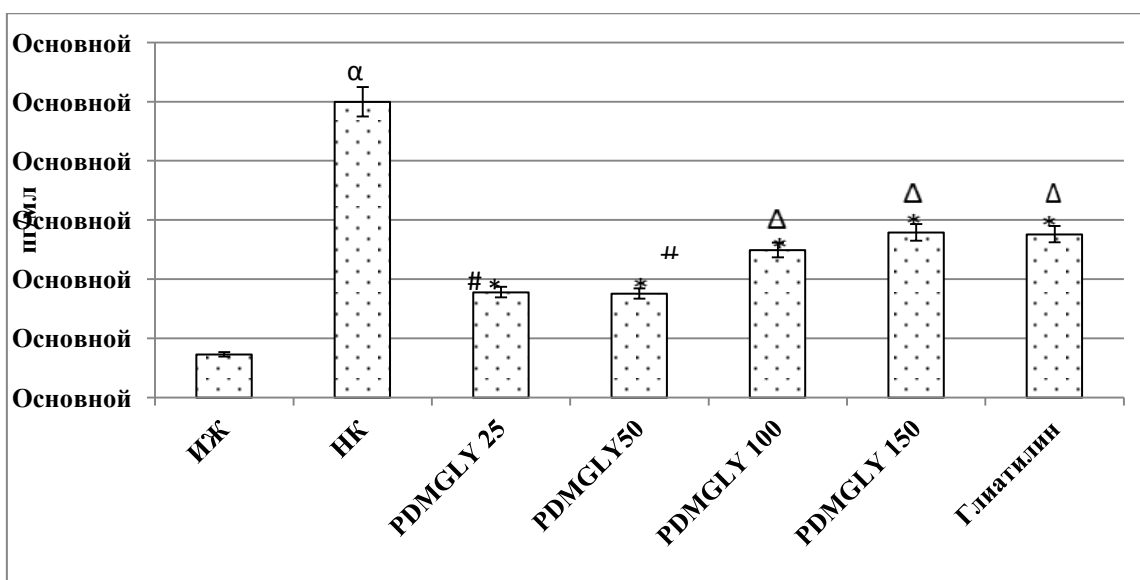


Рисунок 4. Влияние различных доз соединения-лидера и препарата сравнения на изменение сывороточной концентрации белка S100β в условиях экспериментальной ЧМТ

Обозначение: α - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс ИЖ ($p < 0,05$); * - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс НК ($p < 0,05$); # - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших глиатилин ($p < 0,05$); Δ - статистически значимо (критерий Ньюмена-Кейсла) относительно группы крыс, получавших соединение PDMGLY в дозе 50 мг/кг ($p < 0,05$). Обозначение групп аналогично рисунку 1.

Исходя из полученных результатов, для проведения дальнейших исследований была выбрана доза соединения PDMGLY 50 мг/кг, поскольку при ее введении животным был получен наиболее выраженный церебропротекторный эффект при экспериментальной ЧМТ, сопоставимый с эффектом глиатилина.

Оценка ноотропной активности и влияния соединения-лидера PDMGLY на психо-эмоциональный статус животных в условиях экспериментальной ЧМТ

Было установлено, что на фоне внутрибрюшинного введения соединения PDMGLY в тесте «Открытое поле» как горизонтальная, так и вертикальная двигательная активности были достоверно выше, а уровень тревожности животных был существенно ниже показателей крыс без фармакологической поддержки, превосходя при этом значения группы животных, получавших референтный препарат. Влияние исследуемого соединения на поведенческую активность крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» было сопоставимо с данными, полученными в тесте «Открытое поле».

При изучении когнитивных функций в тестах «Водный лабиринт Морриса», «УРПИ» и «ТЭИ» было отмечено, что введение субстанции PDMGLY привело к

сохранению памятного следа животных по отношению к животным НК и превосходило при этом референтный препарат.

Изучение церебропротекторной активности соединения-лидера и препарата сравнения в условиях экспериментальной ЧМТ

Установлено, что субстанция PDMGLY способствовала уменьшению неврологических нарушений по шкале mNSS, что было сопоставимо с группой крыс, получавших глиатилин. На фоне введения изучаемого соединения PDMGLY отмечалось снижение отека головного мозга и проницаемости гемато-энцефалического барьера на 4,8% ($p < 0,05$) и 50,3% ($p < 0,05$) по сравнению с группой крыс НК. При этом статистически значимых отличий между группами животных, которым вводили соединение-лидер и препарат сравнения, не установлено.

При применении соединения PDMGLY активность ЛДГ и КФК-ВВ была меньше на 77,1% ($p < 0,05$) и 70,3% ($p < 0,05$) соответственно, кроме того, содержание NSE и GFAP также уменьшилось на 72,6% ($p < 0,05$) и 96,1% ($p < 0,05$) по отношению к животным без фармакологической поддержки и было сопоставимо с показателями животных, получавших референтный препарат (табл.2).

Таблица 2. Изменение сывороточной концентрации ЛДГ, КФК-ВВ, NSE, GFAP у животных в условиях коррекции ЧМТ соединением PDMGLY и глиатилином

Группа	ЛДГ, ед/л	КФК-ВВ, ед./л	NSE, нг/мл	GFAP, нг/мл
ИЖ	278,2±18,04	390,45±19,1	3,96±0,81	1,22±0,22
НК	611,96±43,97 [#]	744,85±34,22 [#]	15,9±1,05 [#]	29,85±1,32 [#]
Глиатилин	345,61±42,65 [*]	437,3±85,23 [*]	9,3±0,79 [*]	18,8±0,65 [*]
PDMGLY	331,55±27,52 [*]	447,55±60,85 [*]	7,82±0,85 [*]	15,1±0,72 [*]

Примечание: [#]- статистически значимо по сравнению с группой крыс ИЖ (критерий Ньюмена-Кейсла, ($p < 0,05$)); ^{*}- статистически значимо по сравнению с группой крыс НК (критерий Ньюмена-Кейсла, ($p < 0,05$)). Обозначение групп аналогично рисунку 5.

У группы животных НК в условиях экспериментальной ЧМТ установлено повышение средней величины амплитуды дельта и тета ритмов, а также снижение амплитуды высокочастотных бета ритмов во всех анализируемых отведениях. В условиях коррекции ЧМТ соединением PDMGLY у крыс при ЭЭГ исследовании в отведениях С3-

А1 и С4-А2 наблюдалось уменьшение амплитуды дельта ритма по отношению к группе животных, лишенных фармакологической поддержки в 2,8 ($p<0,05$) раза и 5,4 ($p<0,05$) раза соответственно. Также у данной группы крыс, относительно животных НК, мощности тета ритма были ниже в 2,1 ($p<0,05$) раза (отведение С3-А1) и в 5,4 ($p<0,05$) раза (отведение С4-А2), а амплитуда высокочастотного бета ритма в отведениях С3-А1 и С4-А2 достоверно выше в 3 ($p<0,05$) раза и 2,4 ($p<0,05$) раза соответственно, что сопоставимо с полученными показателями группы крыс, которым вводили препарат сравнения глиатилин (табл.3).

Таблица 3. Изменение параметров ЭЭГ у крыс в условиях коррекции ЧМТ соединением PDMGLY и глиатилином

ИЖ					
Отведение	Дельта ритм, мкВ²	Тета ритм, мкВ²	Альфа ритм, мкВ²	Бета НЧ ритм, мкВ²	Бета ВЧ ритм, мкВ²
FP1-A1	1,97±0,023	3,42±0,008	1,31±0,056	3,83±0,006	4,93±0,031
FP2-A2	1,87±0,006	2,97±0,091	1,42±0,002	4,43±0,002	4,86±0,009
С3-А1	1,86±0,064	2,95±0,022	0,92±0,021	3,08±0,021	5,55±0,045
С4-А2	1,67±0,023	3,62±0,004	1,29±0,032	4,95±0,027	5,21±0,064
НК					
FP1-A1	5,42±0,024#	6,87±0,012#	1,21±0,012	3,57±0,033	2,05±0,022#
FP2-A2	4,04±0,001#	6,05±0,003#	1,02±0,001	2,04±0,003	2,06±0,002#
С3-А1	10,15±0,122#	9,12±0,073#	1,42±0,012	2,91±0,026	1,29±0,033#
С4-А2	7,38±0,013#	9,41±0,036#	0,37±0,009	4,87±0,002	1,49±0,001#
PDMGLY					
FP1-A1	2,31±0,006*	3,71±0,003*	1,09±0,039	3,81±0,006	3,54±0,004*
FP2-A2	2,01±0,005*	2,01±0,001*	2,01±0,006	3,02±0,009	2,02±0,003*
С3-А1	3,59±0,003*	4,29±0,003*	1,21±0,061	3,01±0,007	3,81±0,002*
С4-А2	1,37±0,006*	2,75±0,008*	2,6±0,003	4,99±0,012	3,64±0,045*
Глиатилин					
FP1-A1	2,51±1,232*	4,75±0,234*	1,47±0,126	4,34±0,214	3,89±0,297*
FP2-A2	1,92±1,288*	3,89±0,217*	2,49±0,038	4,35±0,238	3,82±0,253*
С3-А1	2,77±0,985*	3,04±0,941*	2,35±0,002	4,04±0,236	2,21±0,321*
С4-А2	2,32±0,318*	4,23±0,648*	2,72±0,054	4,97±0,693	3,97±0,26*

Примечание: #- статистически значимо по сравнению с группой крыс ИЖ (критерий Ньюмена-Кейсла, ($p<0,05$)); *- статистически значимо по сравнению с группой крыс НК (критерий Ньюмена-Кейсла, ($p<0,05$)). Обозначение групп аналогично рисунку 5.

Стоит отметить, что результаты экспериментов подтверждаются гистоморфологическими исследованиями. При оценке состояния ткани головного мозга животных НК группы наблюдались выраженные морфологические изменения, которые характеризовались очаговой деструкцией вещества головного мозга, формированием

некротических очагов, гибелью нейронов. Введение животным соединения PDMGLY и глиатилина привело к сохранению белково-синтетических процессов в нейронах, о чем свидетельствовало наличие тигроидной субстанции при окраске по Нислю, которая располагалась у основания дендритов, что можно расценить как нейропротекторный эффект. В результате проведенного морфометрического анализа установлено снижение проницаемости эндотелия, воспаления и тромбоза на фоне введения соединения PDMGLY, что достоверно отличалось от показателей группы негативного контроля.

Оценка возможных механизмов церебропротекторного действия соединения-лидера PDMGLY в условиях экспериментальной ЧМТ.

При оценке эндотелиальной функции у крыс в условиях экспериментальной ЧМТ установлено, что соединение PDMGLY способствовало восстановлению вазореактивности к АЦХ и L-NAME, а также меньшему проявлению феномена «L-аргининового парадокса» при этом эффект был сопоставим с таковым у референтного препарата (рис.5).

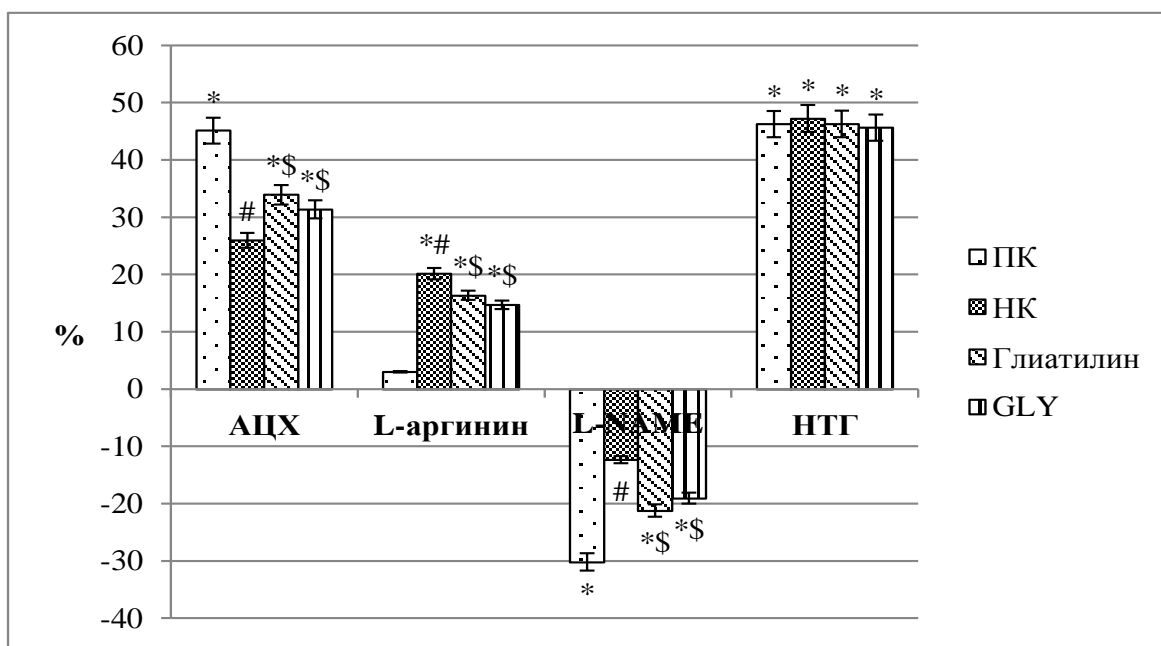


Рисунок 5. Изменение вазодилатирующей функции эндотелия сосудов в условиях коррекции ЧМТ глиатилином и изучаемым соединением PDMGLY

Обозначение: *- статистически значимо относительно исходной скорости мозгового кровотока (критерий Ньюмена-Кейсла); #- статистически значимо относительно ПК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла); \$- статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла). Обозначение групп аналогично рисунку 5.

Введение производного пиримидина PDMGLY способствовало снижению как степени, так и скорости агрегации тромбоцитов по сравнению с группой крыс НК на

модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (рис.6). При этом соединение PDMGLY превосходило препарат сравнения (степень агрегации ниже на 19,2% ($p<0,05$), скорость агрегации – на 51,5% ($p<0,05$)).

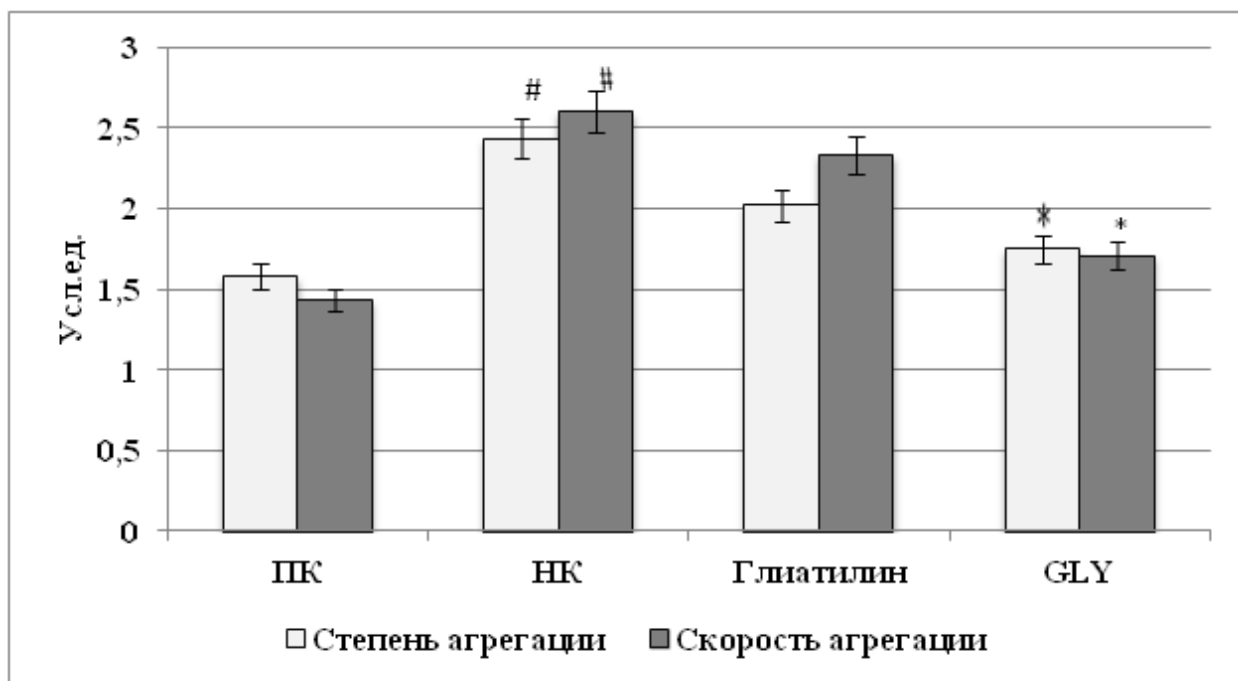


Рисунок 6. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на агрегационную активность тромбоцитов в условиях экспериментальной ЧМТ

Обозначение: # - статистически значимо относительно группы животных ПК ($p<0,05$, критерий Ньюмена-Кейсла); * - статистически значимо относительно группы животных НК ($p<0,056$ критерий Ньюмена-Кейсла). Обозначение групп аналогично рисунку 5.

На фоне введения крысам соединения-лидера PDMGLY отмечалось, как увеличение содержания eNOS на 125,6% ($p<0,05$), так и уменьшение концентрации iNOS на 26,5% ($p<0,05$) относительно группы животных, лишенных фармакологической поддержки (рис.8). Кроме того, содержание eNOS и iNOS на фоне введения крысам соединения-лидера было соответственно выше на 31,6% ($p<0,05$) и ниже на 20,5% ($p<0,05$) по отношению к группе животных, получавших референтный препарат (рис.7).

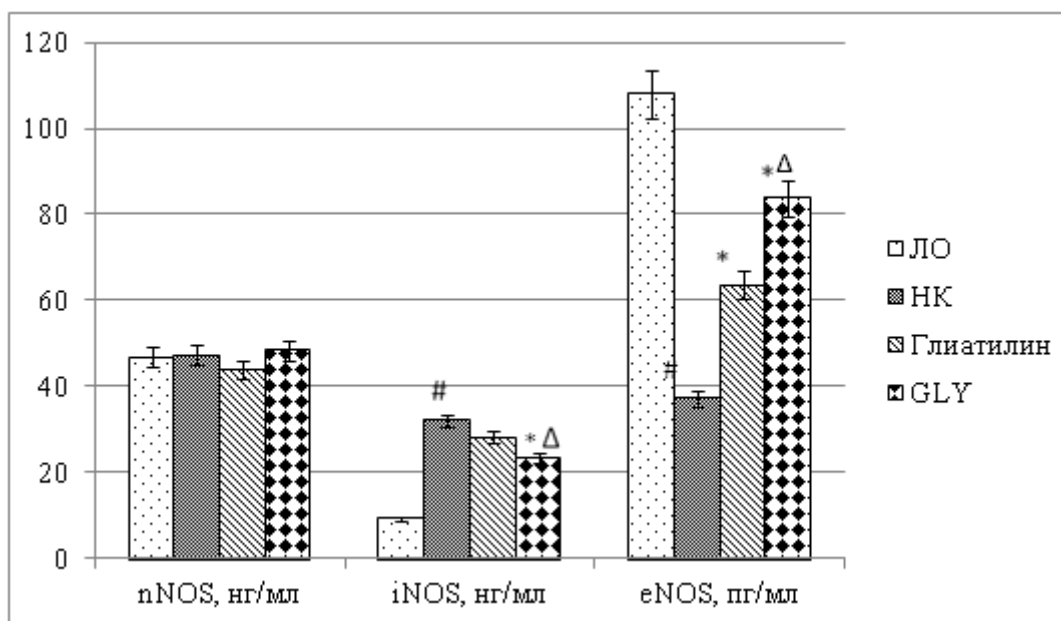


Рисунок 7. Влияние соединения-лидера PDMGLY и препарата сравнения на концентрацию изоферментов синтазы оксида азота в условиях экспериментальной ЧМТ.

Обозначение: # - статистически значимо относительно группы животных ПК ($p < 0,05$, критерий Ньюмена-Кейсла); * - статистически значимо относительно группы животных НК ($p < 0,05$; критерий Ньюмена-Кейсла); Δ - статистически значимо относительно группы животных, получавших глиатилин ($p < 0,05$; критерий Ньюмена-Кейсла). Обозначение групп аналогично рисунку 5.

Введение вещества PDMGLY привело к снижению концентрации СРБ в 2,4 раза ($p < 0.05$) по отношению к группе животных НК и было достоверно ниже по отношению к группе животных, получавших глиатилин. Оценивая изменение концентрации гомоцистеина у крыс на фоне соединения-лидера было достоверно ниже относительно группы животных НК на 34,8% ($p < 0,05$) и статистически значимо не отличалось от группы животных, получавших глиатилин.

Следующий блок работы был направлен на изучение антиоксидантных свойств соединения-лидера. В ходе изучения антиоксидантной активности удалось установить, что на фоне введения исследуемого соединения PDMGLY наблюдалось снижение концентрации МДА и ДК в 2,2 раза ($p < 0,05$) и 2,1 раза ($p < 0,05$) соответственно, кроме того, активность антиоксидантных ферментов, увеличилась (относительно группы животных НК) СОД – на 98,6% ($p < 0,05$); ГП – 2,3 ($p < 0,05$) раза; каталазы – в 3,6 раза ($p < 0,05$); Г6Ф-ДГ – в 2,7 раза ($p < 0,05$) и ГР – на 72,4% ($p < 0,05$) (табл.4). Необходимо

отметить, что активность СОД и ГП на фоне введения животным соединения-лидера превосходило аналогичные показатели животных, получавших референтный препарат на 53,4% ($p<0,05$) и 31,5% ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 4. Влияние исследуемого соединения PDMGLY и препарата сравнения на состояние про/антиоксидантного баланса в условиях экспериментальной ЧМТ

Группа	ПК	НК	PDMGLY	Глиатилин
Г6Ф-ДГ, Ед/л	4157,38±185,845	1141,01±39,792#	3032,13±285,216*	2477,13±267,171*
ГР, Ед/л	28,17±3,096	11,36±0,719#	19,59±1,594*	15,49±1,768*
СОД, Ед/л	289,5±5,239	95,2±2,314#	189,1±2,964*Δ	123,2±7,452*
ГП, Ед/л	590,3±2,861	180,3±9,674#	401,4±5,561*Δ	305,2±4,231*
Каталаза, мкат/л	0,765±0,0214	0,211±0,0361#	0,676±0,0221*	0,363±0,0451*
МДА, мкмоль/л	5,2±0,912	34,3±2,756#	15,3±2,276*	20,2±2,971*
ДК, мкмоль/л	11,1±1,237	25,2±2,317#	12,1±2,642*	18,3±3,124*

Обозначение: # - статистически значимо относительно ПК группы животных ($p<0,05$, критерий Ньюмена-Кейсла); * - статистически значимо относительно НК группы животных ($p<0,05$; критерий Ньюмена-Кейсла); Δ - статистически значимо относительно группы животных, получавших глиатилин ($p<0,05$; критерий Ньюмена-Кейсла). Обозначение групп аналогично рисунку 5.

Заключительный блок был направлен на оценку влияния исследуемой субстанции на маркеры апоптоза, а также транспортер глюкозы 1 (GLUT1) в условиях экспериментальной ЧМТ. Соединение PDMGLY способствовало уменьшению клеточной гибели, что отражалось в снижении TNF-α, каспазы-3 и AIF – в 3,2 раза ($p<0,05$), в 2,1 раза ($p<0,05$) и на 104,1% ($p<0,05$) и увеличению концентрации JNK на 78,1% ($p<0,05$) относительно группы крыс НК. Кроме того, по показателям AIF и JNK группа крыс, получавших PDMGLY, значимо отличалась от данных группы животных, которым вводили глиатилин (рис.8). На фоне введения соединения-лидера также отмечено увеличение индукции GLUT1, способствующего переносу глюкозы.

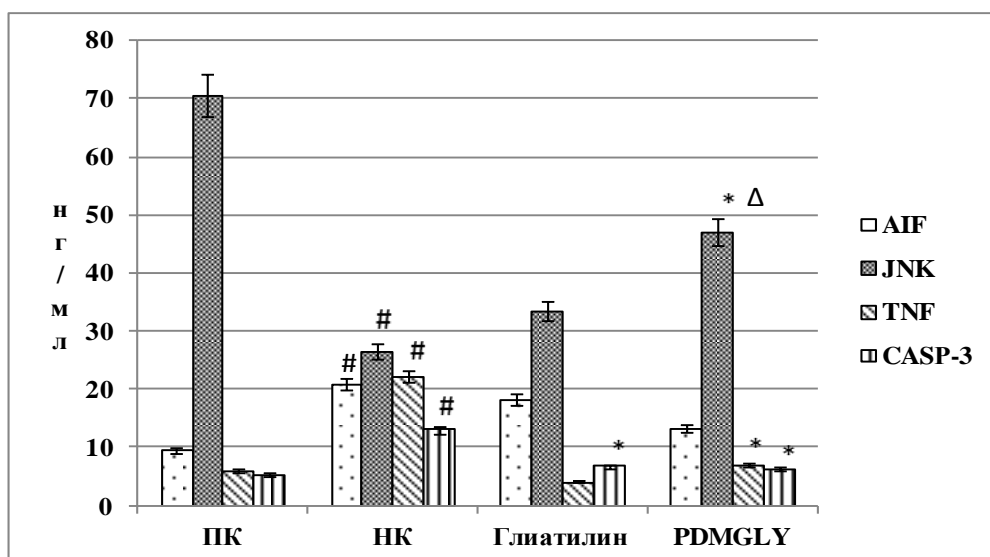


Рисунок 8. Влияние исследуемого PDMGLY и референтного препарата на изменение концентрации апоптотических систем в условиях экспериментальной ЧМТ

Обозначение: # - статистически значимо относительно группы животных ПК ($p < 0,05$, критерий Ньюмена-Кейсла); * - статистически значимо относительно группы животных НК ($p < 0,05$; критерий Ньюмена-Кейсла); Δ - статистически значимо относительно группы животных, получавших глиатилин ($p < 0,05$; критерий Ньюмена-Кейсла). Обозначение групп аналогично рисунку 5.

Таким образом, проведенный этап исследования свидетельствовал о наличии у изучаемого соединения поливалентного механизма церебропротекторной активности.

Заключение

В ходе проведенной работы доказано, что в ряду производных пиримидин-4(1H) - она наиболее выраженным церебропротекторным действием обладает соединение под лабораторным шифром PDMGLY в дозе 50 мг/кг, которое проявлялось в уменьшении неврологической, сенсомоторной симптоматики, увеличении линейной скорости мозгового кровотока, снижении концентрации лактата, цереброспецифичного белка S100β, а также увеличении утилизации глюкозы.

В ходе изучения потенциальных механизмов действия установлено, что исследуемый объект способствует восстановлению эндотелиальной функции, редукции окислительного стресса, процессов апоптоза и увеличению энергообеспечения. Доказанная в ходе настоящего исследования высокая терапевтическая эффективность производного пиримидин-4-1(H) - она -PDMGLY, превосходила эффекты препарата сравнения глиатилина. При этом комплексный характер действия соединения-лидера,

который затрагивает несколько ветвей вторичного повреждения головного мозга в результате ЧМТ, делает данное соединение перспективным для дальнейшего изучения с целью создания на его основе лекарственного средства, оказывающего церебропротекторное действие в условиях ЧМТ.

Научно-практические рекомендации

1. Следует продолжить дальнейшее исследование соединения PDMGLY с целью создания на его основе церебропротекторного лекарственного препарата для лечения черепно-мозговой травмы

2. Результаты экспериментальной работы позволяют рекомендовать химикам-синтетикам целенаправленный поиск и синтез в ряду пиримидинов, новых высоко активных соединений для коррекции церебральных нарушений различного генеза

Выводы

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

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

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

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

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

6. Введение исследуемого объекта PDMGLY способствовало снижению (относительно крыс, лишенных фармакологической поддержки) активности ЛДГ (на

77,1% ($p < 0,05$)), КФК-ВВ (на 65% ($p < 0,05$)), концентрации NSE и GFAP (на 113,9% ($p < 0,05$) и 96,1% ($p < 0,05$) соответственно), степени гидратации и проницаемости ГЭБ, а также восстановлению биоэлектрического потенциала нейронов, уменьшению неврологического дефицита и было сопоставимо с глиатилином.

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

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

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ

1. Воронков А.В., Калашникова С.А., Хури Е.И., Поздняков Д.И. Моделирование черепно-мозговой травмы в условиях эксперимента у крыс // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25242> (дата обращения: 25.04.2019).

2. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Хури Е.И., Рыбалко А.Е. Сравнение антиоксидантной активности мексидола при повреждениях головного мозга различного генеза в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25392> (дата обращения: 25.04.2019).

3. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Хури Е.И., Кульбекова Ю.Е., Кобин А.А. Оценка антиоксидантной активности 4-гидрокси-3,5-дитретбутилко-ричной кислоты, мексидола и тиоктовой кислоты на модели фокальной ишемии головного мозга // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. -2017. -Т. 60, №2. -С. 48-52.

4. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Хури Е.И., Воронкова М.П. Влияние производного пиримидин-4-1(Н)-она на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов у крыс в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы // Дневник Казанской медицинской школы. -2018.- №3(21).-С. 23-27

5. Воронков А. В., Поздняков Д.И., Нигарян С.А., Хури Е.И., Мирошниченко К.А., Сосновская А.В., Олохова Е.А. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза // Фармация и фармакология. – 2019. – Т. 7. – №. 1. – С. 20-31.

6. Воронков А.В., Хури Е.И., Поздняков Д.И., Кульбекова Ю.Е., Кобин А.А. Изучение антиоксидантной активности производных пиримидин-4(1н) -она при черепно-мозговой травме в условиях эксперимента // Экспериментальная и клиническая фармакология.-2019.-Т.82, №1.- С.8-10.

Работы, опубликованные в других изданиях

7. Voronkov A. V., M. M. Khaled, Khoury E. I., Pozdnyakov D. I. The treatment of traumatic brain injury in experimental animals by pyrimidine derivatives // Int. J. of Adv. Res.-2019.-№ 7 (3).-С. 799-803

8. Хури Е.И. Оценка влияния производных пиримидин-4-(она) на показатели антиоксидантного статуса в условиях экспериментально вызванной черепно-мозговой травмы // В книге: Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству Материалы III международной научно-практической конференции. 2017. С. 63-65.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЧМТ – черепно-мозговая травма	ЭЭГ – электроэнцефалограмма
NOS – синтаза оксида азота	КФК-ВВ - креатинфосфокиназа-ВВ
eNOS- эндотелиальная синтаза оксида азота	ЛДГ – лактатдегидрогеназа
iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота	АЦХ – ацетилхолин
nNOS – нейрональная синтаза оксида азота	L - NAME - нитро-L—аргинин метиловый эфир
ПОЛ – перекисное окисление липидов	ДК - диеновые конъюгаты
ФНО – фактор некроза опухоли	МДА - малоновый диальдегид
GLUT – транспортер глюкозы	СОД - супероксиддисмутаза
AIF – апоптоз-индуцирующий фактор	ГП – глутатионпероксидаза
JNK - c-Jun-концевая киназа	ГР - глутатионредуктаза
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер	Г6Ф-ДФ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
mNSS – (modified neurological severity score)	GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок
УРПИ - условный рефлекс пассивного избегания	NSE - нейрон-специфичная енолаза
ТЭИ - тест «экстраполяционного избавления»	CASP-3 - каспаза -3
	ИЖ – интактные животные;
	НК – группа крыс негативного контроля