

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

На правах рукописи

Даниелян Сирануш Артуровна

**КОРРЕКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ
ПРОИЗВОДНЫМИ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И ФЛАВОНОИДАМИ В
УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО
МОЗГА**

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Поздняков Дмитрий Игоревич
кандидат фармацевтических наук, доцент

Волгоград – 2024

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы	13
1.1. Эпидемиология, социально-экономические аспекты, осложнения ишемического инсульта	13
1.2. Патогенез ишемического инсульта	15
1.3. Окислительный стресс	18
1.4. Эндотелиальная дисфункция.....	19
1.5. Роль нейровоспаления в патогенезе ишемического инсульта	20
1.6. Митохондрии – перспективная мишень для церебропротекторных средств	22
1.7. Фармакологическая коррекция ишемического инсульта. Церебропротекторы, как средства, применяемые в клинической терапии цереброваскулярных патологий. Перспективы развития группы церебропротекторов	29
1.8. Противовоспалительные свойства мальвидина и его гликозидов	38
1.9. Церебропротекторные эффекты мальвидина и его производных	40
1.10. Потенциальное применение мальвидина и его гликозидов	41
ГЛАВА 2. Материалы и методы	44
2.1. Лабораторные животные	44
2.2. Характеристика исследуемых соединений	45
2.3. Дизайн исследования	47
2.4. Модель церебральной ишемии	52
2.5. Методы оценки церебропротекторной активности	53
2.5.1 Методы определения поведенческого и сенсомоторного дефицита.....	53
2.5.2 Определение размера зоны некроза.....	55
2.5.3 Определение степени гидратации ткани головного мозга	56
2.5.4 Определение концентрации лактата, пировиноградной кислоты в сыворотке крови	56
2.5.5 Определение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови ..	57
2.6. Методы оценки эндотелиальной дисфункции.....	58
2.6.1 Методы регистрации скорости мозгового кровотока и оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов	58
2.6.2 Определение агрегации тромбоцитов и скорости оседания тромбоцитов	59

ГЛАВА 4. Влияние различных доз мальвидина на степень некроза головного мозга, концентрацию лактата и пирувата	96
4.1. Оценка влияния различных доз мальвидина на изменение зоны некроза головного мозга	96
4.2. Оценка влияния различных доз мальвидина на концентрацию молочной, пировиноградной кислот в сыворотке крови в условиях фокальной церебральной ишемии	98
ГЛАВА 5. Выяснение потенциального механизма действия мальвидина	101
5.1. Исследование эндотелиопротекторного действия мальвидина в условия фокальной церебральной ишемии.....	101
5.1.1 Влияние соединения лидера мальвидина и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной церебральной ишемии	101
5.1.2 Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии	104
5.2. Исследование влияния соединения-лидера и препаратов сравнения на активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталазы) в условиях церебральной ишемии.....	105
5.3. Исследование влияния соединения-лидера и препаратов сравнения на респирометрическую функцию митохондрий в условиях церебральной ишемии	110
5.3.1 Влияние соединения-лидера на респирометрическую функцию митохондрий в условиях фокальной ишемии головного мозга.....	111
5.3.2 Изменение процессов гликолиза на фоне введения препаратов сравнения и соединения-лидера в условиях церебральной ишемии	113
5.3.3 Изменение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи под влиянием препаратов сравнения и соединения-лидера в условиях церебральной ишемии.....	114
5.3.4 Влияние мальвидина на активность митохондриальной поры.....	116
5.3.5 Исследование влияния мальвидина на концентрацию кальция в головном мозге.....	117

5.3.6 Влияние мальвидина и препаратов сравнения на митохондриальный мембранный потенциал в условиях фокальной ишемии головного мозга	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ГЛАВА 6. Обсуждение результатов	123
ВЫВОДЫ	134
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	137
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Цереброваскулярные заболевания, в числе которых ишемический инсульт, остаются актуальной проблемой здравоохранения многих стран. Инсульт – одна из основных причин инвалидизации и смертности населения, что позволяет рассматривать вопрос не только в концепции проблем медицины, но и характеризует заболевание как социально и экономически значимое (Virani, S.S., Alonso, A., Benjamin, E.J., 2020). В Российской Федерации (РФ) 20% от общего числа лиц, перенесших инсульт, составляют люди трудоспособного возраста (от 20 до 59 лет). Порядка 100 тыс. повторных инсультов регистрируется в РФ ежегодно, только 13% лиц, перенесших инсульт, восстанавливаются полностью, 30% людей после перенесенного инсульта нуждаются в постоянной помощи, теряют дееспособность (Skvorcova, V.I., 2004; Литвинова, М.А., 2017). В 2016 году в мире было зарегистрировано 13,4 млн случаев возникновения инсульта, из которых около 87% - ишемический инсульт. Соответственно, ишемический инсульт остается важнейшей проблемой, а профилактика и терапия ишемических состояний входят в ряд главных задач современной медицины (Saini, V., Guada, L., Yavagal, D.R., 2021).

Фармакотерапии ишемического инсульта присущ комплексный подход, который включает применение таких групп ЛП, как тромболитические, церебропротекторные, антиоксидантные, мембраностабилизирующие и т. д. (Renu, A., Millan, M., San Roman, L., et al., 2022). При этом обширный список средств, применяемых при ишемическом инсульте, обладает рядом побочных эффектов, что усложняет терапию и не совсем удовлетворяет требованиям специалистов (Ajoalabady A. et al, 2021). Соответственно, поиск новых эффективных средств,

направленных на лечение и/или профилактику ишемического инсульта – задача, стоящая перед современной фармакологией и здравоохранением.

Степень разработанности темы

Существующий сегодня широкий список препаратов для терапии цереброваскулярных патологий нельзя назвать совершенным ввиду того, что препараты способны вызывать осложнения у пациентов, перенесших инсульт. Другая проблема заключается в исследовании применяемых препаратов: единственный препарат с доказанной эффективностью — это тканевой активатор плазминогена, но из-за узкого терапевтического окна его нельзя считать эффективным и безопасным средством (Farina, M. et al, 2021).

В последние годы в мире возрастает интерес к ЛС растительного происхождения, что обосновано минимальным проявлением побочных эффектов и широким спектром фармакологических эффектов. Отдельным классом природных соединений, которые потенциально могут обладать церебропротекторными свойствами являются флавоноиды и производные коричневых кислот (Grabska, A., Kobylecka, I., Szpakowski, P., 2023). Исследования последних лет показывают, что данные группы соединений способны проявлять антиоксидантное, ноотропное, метаболическое, гипогликемическое, противовоспалительное, эндотелиопротекторное действие, а также способны улучшать митохондриальную функцию (Lui, A., Hu, J., Yeh, T.S., et al, 2021).

Таким образом, поиск новых церебропротективных средств среди фармакологически активных соединений растительного происхождения особо актуален и может стать новым перспективным направлением для профилактики и/или терапии цереброваскулярных заболеваний.

Цель исследования

Провести коррекцию митохондриальной дисфункции производными коричневой кислоты и флавоноидами в условиях экспериментальной ишемии головного мозга.

Задачи исследования

- Провести фармакологический скрининг в ряду флавоноидов и производных коричной кислоты с целью выявления наиболее эффективного соединения в условиях фокальной ишемии головного мозга крыс.
- Выявить зависимость «доза-эффект» у соединения-лидера в условиях фокальной церебральной ишемии.
- Изучить влияние соединения-лидера на объем зоны некроза, степень отека, концентрации лактата, пирувата и гомоцистеина в условиях церебральной ишемии.
- Выявить потенциально возможные церебропротекторные механизмы действия у соединения-лидера в условиях экспериментальной фокальной ишемии головного мозга крыс:
 - провести оценку эндотелиопротекторной активности соединения-лидера;
 - оценить влияние соединения-лидера на активность ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза);
 - исследовать способность соединения-лидера подавлять нейровоспаление;
 - оценить влияние соединения-лидера на митохондриальную дисфункцию;
 - изучить влияние соединения-лидера на концентрацию кальция в гомогенате головного мозга.

Научная новизна исследования

В данном исследовании проведена оценка церебропротекторных свойств производных коричной кислоты и флавоноидов (степень некроза и отека головного мозга крыс, концентрация лактата и пирувата, влияние растительных веществ на когнитивные и мнестические функции животных в условиях фокальной церебральной ишемии), по результатам которой

выбрано соединение-лидер. Проведено дозозависимое исследование церебропротекторной активности соединения-лидера, определена наиболее эффективная доза вещества. Дана оценка влияния соединения-лидера на активность антиоксидантных ферментов, эндотелиопротекторное, противовоспалительное действие. Выявлен потенциальный механизм действия соединения-лидера. Изучено влияние соединения-лидера на митохондриальную функцию в условиях экспериментальной ишемии головного мозга, а именно, исследована общая респирометрическая функция митохондрий (АТФ-генерирующая способность, максимальный уровень дыхания, респирометрическая ёмкость), исследовали состояние митохондриального мембранного потенциала, работу митохондриальной поры и активность митохондриальных комплексов. Также оценивали уровень внутриклеточного кальция, который может характеризовать как функциональное состояние митохондрий, так и выступать в качестве маркера патологий ишемического генеза.

Теоретическая и практическая значимость работы

По результатам экспериментального исследования сделан вывод, что мальвидин - вещество растительного происхождения, относящегося к группе антоцианов, обладает церебропротекторным действием. Соответственно, мальвидин представляет собой перспективное соединение растительного происхождения для дальнейшего более углубленного изучения и создания на его основе церебропротекторного средства с многотаргетным действием для лечения и/или профилактики патологий ишемического характера. Результаты, полученные в ходе экспериментальной работы, представляются интересными для химиков при целенаправленном поиске веществ растительного происхождения, которые обладают способностью корректировать нарушения, характерные для ишемических патологий различного генеза. Результаты диссертационного исследования используются в рамках образовательного процесса на кафедре

фармакологии с курсом клинической фармакологии, кафедре органической химии ПМФИ -филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ.

Методология и методы исследования

В ходе экспериментально-исследовательской работы для оценки цереброваскулярной патологии применялся комплексный подход. Экспериментальные работы соответствовали этическим нормам работы с лабораторными животными. Диссертационное исследование реализовано с применением современных методик, оборудования и с достаточным количеством биологических моделей, адекватных поставленным задачам дизайна исследования.

Положения, выносимые на защиту

В ряду соединений растительного происхождения – производных коричной кислоты (4 соединения) и флавоноидов (9 соединений) наиболее эффективным церебропротекторным действием в условиях фокальной ишемии головного мозга крыс обладает мальвидин.

Наиболее выраженный церебропротекторный эффект в условиях фокальной ишемии мальвидин оказывает в дозе 100 мг/кг.

Установлено, что мальвидин способствует уменьшению размера зоны некроза, отека ткани головного мозга, понижает концентрацию лактата, пирувата, гомоцистеина, а также оказывает положительное влияние на когнитивные и мнестические функции в условиях фокальной церебральной ишемии в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Тест экстраполяционного избавления» и «Условная реакция пассивного избегания».

Выявлено, что мальвидин оказывает эндотелиопротекторное, антитромботическое действие, увеличивает активность ферментов эндогенной антиоксидантной защиты. В условиях церебральной ишемии мальвидин улучшает митохондриальную функцию, что выражается в

увеличении активности митохондриальных комплексов (I, II, IV, V), усилении общей респирометрической функции, улучшении процессов гликолиза, а также коррекции работы митохондриальной мембраны, митохондриального мембранного потенциала и понижении концентрации кальция в гомогенате головного мозга крыс.

Личный вклад автора

Автор активно принимал участие во всех этапах диссертационной работы. Выполнен сбор и анализ литературных данных, по которым разработаны протоколы экспериментов, сформирован и проведен дизайн исследования, а также последующая обработка и анализ полученных результатов, которые отражены в научных публикациях.

Степень достоверности и апробации результатов

В работе применялись современные подходы и инновационное оборудование, что соответствовало методическим рекомендациям по доклиническому исследованию. По итогам эксперимента получено достаточное количество экспериментальных данных, которые были статистически обработаны, что позволяет считать полученные результаты достоверными. Основные положения диссертационной работы были представлены на научных конференциях и симпозиумах: VI международной научно-практической конференции «Беликовские чтения», Пятигорск 2019; Международной научно-практической конференции «Взаимодействие науки и общества – путь к модернизации и инновационному развитию», г. Тюмень, 2019; XXVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», г. Москва, 2019; VII международной научно-практической конференции «Беликовские чтения», г. Пятигорск, 2020; Международной научно-практической конференции «Системная трансформация – основа устойчивого инновационного развития», г. Новосибирск, 2020; Международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы реализации междисциплинарных исследований», г. Волгоград, 2022. По результатам и материалам диссертационной

работы опубликовано 17 печатных работ, в том числе 7 рецензируемых. в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 5 статей, индексируемых в базе данных Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, 3 главы собственных исследований, обсуждение результатов, общие выводы, научно-практические рекомендации и библиографический список, состоящий из 253 источников, из которых 39 отечественных и 214 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста, содержит таблиц – 10, рисунков – 22.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология, социально-экономические аспекты, осложнения ишемического инсульта

Инсульт – одна из основных причин смертности и инвалидизации населения в мире (Рисунок 1). Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), ежегодно во всем мире около 15 млн человек страдают от инсульта, из них примерно 5 млн случаев заканчивается летальным исходом и еще 5 млн лиц, перенесших инсульт, становятся нетрудоспособными [1, 2]. Инсульт - состояние, характеризующееся острым снижением кровотока в головном мозге, которое лишает ткань мозга кровоснабжения и оксигенации, за которым иногда следует реперфузия, приводящая к необратимому повреждению мозга и последующим моторным и когнитивным нарушениям [3, 4].

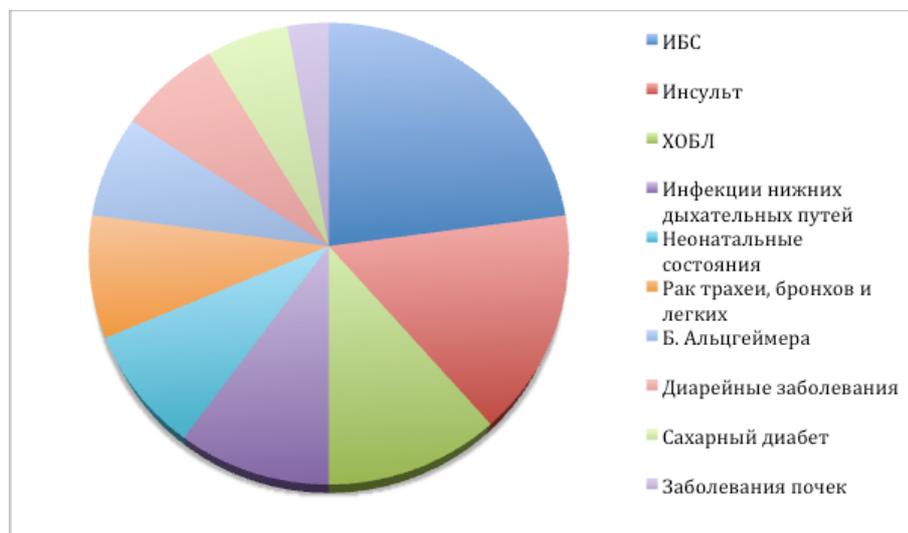


Рисунок 1 – Основные причины смертности населения по данным ВОЗ на 2019 г. [5]

Примечание: Ишемический инсульт – вторая причина смертности во всем мире.

Выделяют два вида инсультов: ишемический и геморрагический. Геморрагический инсульт возникает вследствие разрыва кровеносных

сосудов и последующего кровоизлияния в паренхиму головного мозга. Ишемический инсульт встречается чаще геморрагического (примерно 87% случаев) и является следствием нарушения кровотока в головном мозге из-за закупорки сосуда [6,7].

Общепризнанной классификацией патогенетических подтипов ишемического инсульта является классификация TOAST, основанная главным образом на этиологии (Adams H. P. et al. 1993) [1]. Существует пять патогенетических подтипов ишемического инсульта:

- атеротромботический (вследствие атеросклероза крупных артерий),
- кардиоэмболический (14–30%),
- лакунарный (вследствие окклюзии перфорантной артерии, составляет 15–25% всех ишемических инсультов),
- инсульт другой установленной этиологии,
- инсульт неустановленной этиологии [1].

Большинство ишемических инсультов вызваны атеросклерозом, поражающим артерии крупного калибра и эмболией сердечного генеза. Примерно 45% ишемических инсультов вызываются тромбом в малой или большой артерии [8, 9]. Следовательно, эмболия сердца, атеросклероз мозгового кровообращения и окклюзия мелких сосудов – основные причины ишемического инсульта.

В настоящее время инсульт остается основной медико-социальной проблемой здравоохранения многих стран мира. Среди европейских стран показатель смертности от цереброваскулярных заболеваний в России самый высокий. Так как в Российской Федерации организации по официальной статистике рассматривают цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) как одну нозологическую форму, не выделяя отдельно инсульт, достоверные данные эпидемиологии по распространенности инсульта в Российской Федерации отсутствуют. Однако, данные Федеральной службы государственной статистики Российской Федерации свидетельствуют, что ЦВЗ занимают

второе место в перечне причин смерти от сердечно-сосудистых заболеваний 39%, при этом в структуре общей смертности населения доля инсультов составляет 21,4%. Летальный исход в острый период инсульта наблюдается в 35% случаев, а 50% больных умирают к первому году с момента его развития [10].

Среди причин первичной инвалидности трудоспособного населения инсульт занимает первое место (32 на 100 тыс. населения). Только 10–20% восстанавливают свою дееспособность, из них около 8% возвращаются к работе, а 25% нуждаются в постоянной помощи. После перенесенного инсульта со временем у 30% больных развивается деменция, с возрастом она имеет тенденцию к увеличению. Тяжелый неврологический дефицит постинсультного состояния включает в себя двигательные и когнитивные расстройства, которые снижают качество жизни больного [11, 12]. Говоря об инсульте с точки зрения экономики, следует отметить, что в Российской Федерации на лечении больных ЦВЗ отводится до 20% всего бюджета здравоохранения страны [13-14]. Таким образом, инсульт представляет собой важную социально-экономическую проблему.

Соответственно, реабилитация лиц, перенесших инсульт, должна быть эффективной, своевременной, а также комплексной, что остается актуальной задачей для здравоохранения.

1.2. Патогенез ишемического инсульта

Ишемический инсульт приводит к снижению мозгового кровотока, к дефициту кислорода, глюкозы, липидов и, как следствие, к некрозу ткани головного мозга. Множественные механизмы, включая эксайтотоксичность, эндотелиальную дисфункцию (ЭД), окислительный стресс, нейровоспаление, и митохондриальную дисфункцию, объясняют повреждение головного мозга, вызванное ишемией (Рисунок 2) [15,16].

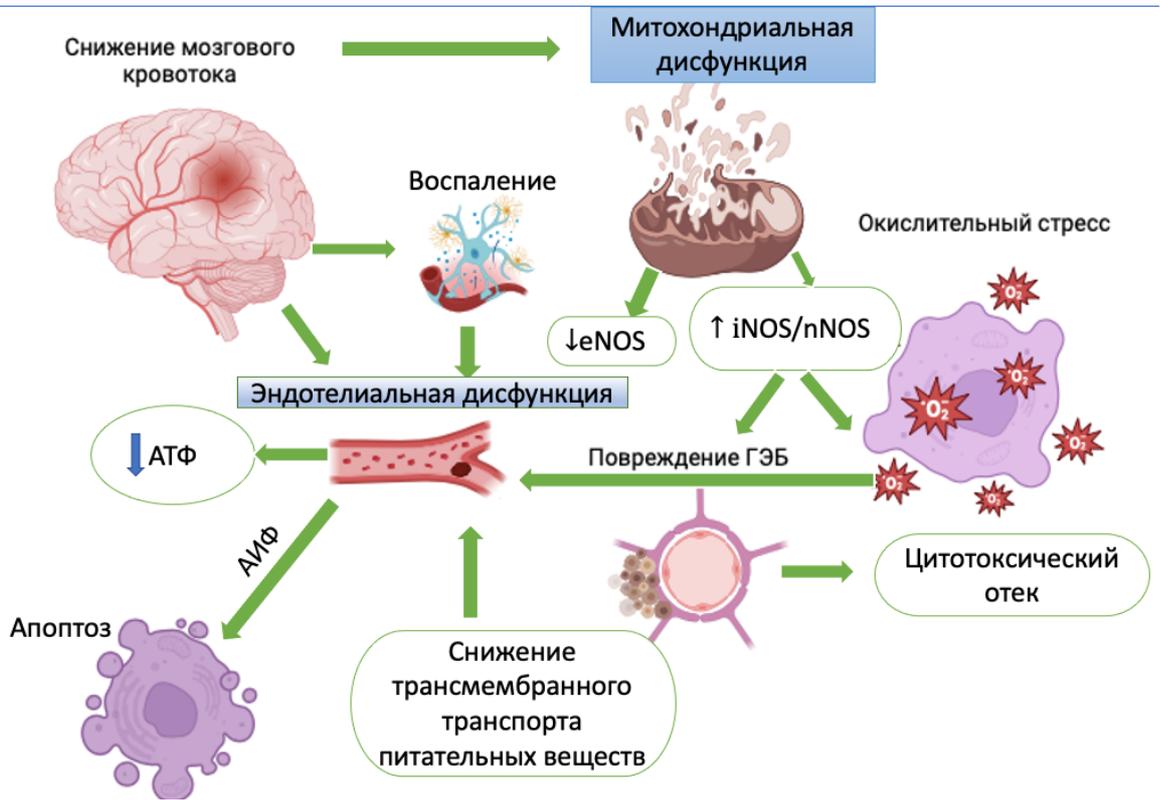


Рисунок 2 – Особенности патогенеза ишемического инсульта

Примечание: Рисунок создан в программе «Biorender» (biorender.com).

Окклюзия церебральной артерии вызывает гипоксию и снижение синтеза глюкозы, лактатацидоз, и другие клеточные и молекулярные процессы, которые приводят к необратимому повреждению мозга [17]. Нейроны, обладая высокой чувствительностью к ишемическим состояниям, быстро перестают функционировать и погибают после инсульта [18]. Митохондриальная дисфункция, обусловленная снижением кровотока, приводит к истощению АТФ и перепроизводству реактивных окислительных форм (АФК). Истощение АТФ запускает ишемические каскады, включая отказ мембранного ионного насоса, приток натрия, хлора и воды, отток клеточного калия и деполяризацию мембраны [19].

Одним из биомаркеров ишемического инсульта и митохондриальной дисфункции, как отдельной группы генетических заболеваний, считается гомоцистеин. В условиях гипоксии и дисфункции митохондрий,

развивается гомоцистеинемия, которая в свою очередь провоцирует перекисное окисление липидов (ПОЛ) и вызывает повреждение эндотелия сосудов, ускоряя агрегацию тромбоцитов. Известно, что многие патологии, в числе которых заболевания ЦНС и сердечно-сосудистые, связаны с повышенной концентрацией гомоцистеина [20, 21]. Соответственно, можно рассматривать гомоцистеин как важнейший биомаркер инсульта и дисфункции митохондрий.

На фоне ишемического инсульта наблюдается сложный каскад патофизиологических процессов, включая эксайтотоксичность, эндотелиальную дисфункцию, митохондриальный ответ, окислительный стресс и апоптоз. Эти патофизиологические процессы вредны для нейронов, глиальных и эндотелиальных клеток и, будучи сопряженными, усиливают активность друг друга, что в итоге приводит к некрозу [5, 22–24]. После ишемического инсульта наблюдается формирование ишемического очага, который включает ядро инфаркта и ишемическую полутень. Приток крови к «ядру инфаркта» снижается ниже минимального порога энергетической необходимости (15–20%) и подвергается некротической гибели клеток [25]. Ишемическая полутень – это окружающие ткани с нарушенными функциями, которые содержат метаболически активные клетки, гибель клеток в этой области происходит медленнее и их еще возможно спасти [26]. В области полутени в первые часы ишемии клетки могут быть восстановлены, это достигается коллатеральным кровообращением, которое обеспечивает питание нейронов кислородом и глюкозой [25]. Поэтому большинство терапевтических методов, направленных на защиту нейронов от патологических механизмов, нацелены на зону пенумбры, и именно эта область является фармакологической мишенью для лечения острого ишемического инсульта [27].

1.3. Окислительный стресс

Эндогенная антиоксидантная система организма может противостоять небольшому количеству свободных радикалов. Она включает в себя такие ферменты, как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и глутатионпероксидаза (ГП). Функции данных элементов антиоксидантной системы заключаются в обезвреживании свободных радикалов, АФК, путем торможения процессов свободнорадикального окисления [28]. Однако, в условиях ишемии и митохондриальной дисфункции наблюдается сбой эндогенной ферментной системы, а концентрация АФК, пероксинитрита и других свободных радикалов настолько высока, что может привести к апоптозу или некрозу [29]. Митохондрии являются основным источником внутриклеточных АФК [30]. После инсульта в результате реакции присоединения свободного электрона к кислороду в них образуется супероксид анион (O^{2-}). Впоследствии активный кислород реагирует с оксидом азота (NO), и образуется пероксинитрит, который последовательно вызывает синтез цитотоксических радикалов и модификацию основных клеточных структур, таких как ДНК, белки и липиды [31]. Очевидно, что продолжительная дисфункция митохондрий имеет риск перепроизводства АФК. Баланс между образованием АФК и их утилизацией во время церебральной ишемии нарушается, что приводит к повреждению клеток, вызванному окислительным стрессом. В некоторых исследованиях показано, что ингибирование комплексов I и III электрон-транспортной дыхательной цепи митохондрий приводило к чрезмерной генерации АФК, а также к уменьшению митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) и открытию митохондриальной поры, что, несомненно расценивалось как митохондриальная дисфункция [32-33].

Соответственно, антиоксидантная защита нейронов в условиях ишемического состояния мозга занимает важную роль в комплексной фармакотерапии ишемического инсульта [34].

1.4. Эндотелиальная дисфункция

Эндотелиальные клетки являются важным компонентом церебральных кровеносных сосудов и легко повреждаются при ишемии головного мозга [35-36]. Эндотелий обеспечивает баланс между вазодилатацией и вазоконстрикцией сосудов, ингибированием и стимулированием миграции и пролиферации гладкомышечных клеток, фибринолизом и тромбообразованием, а также ингибированием, стимуляцией агрегации тромбоцитов и экспрессии провоспалительных цитокинов и молекул адгезии [37-38]. Для выполнения всех этих функций эндотелий секретирует вещества с сосудорасширяющими, антитромботическими и антипролиферативными свойствами (NO, простаглицлин, PGI₂), с сосудосуживающими эффектами (Ангиотензин II), с протромботическими эффектами (фактор фон Виллебранда, ингибитор-1 активатора плазминогена (PAI-1), а также с антикоагулянтным действием – плазминогена (tPA) [37, 38]. Эндотелиальная дисфункция определяется как дисбаланс между секрецией вазодилатирующих и вазоконстрикторных веществ, который сдвигает сосудистую сеть в протромботическую и проатерогенную сторону, для чего характерно сужение сосудов, адгезия лейкоцитов, активация тромбоцитов, нарушением коагуляции, воспаление сосудов и тромбоз [38-39]. В условиях гипоксии снижение синтеза, высвобождения и/или активности NO, происходящего из эндотелия, является самым ранним и одним из наиболее важных процессов, характеризующих эндотелиальную дисфункцию [37]. При ишемическом повреждении мозга NO высвобождается из эндотелиальных клеток в ответ на снижение мозгового кровотока [37-39], его активность может быть дополнительно увеличена ацетилхолином, брадикинином и серотонином [60]. NO определяет множественные эффекты, в том числе сосудорасширяющее и антитромботическое действия [36], а также

ингибирование экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов [38]. Он также подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов [40], окисление ЛПНП, а также цитокин-индуцированную экспрессию VCAM-1 [41] и MCP-1 посредством ингибирования сигнального пути NF-κB [42]. Снижение биодоступности NO является основной причиной возникновения эндотелиальной дисфункции. Это может быть результатом снижения экспрессии белка eNOS [43] и/или нарушения его активности, вызванного разобщением, опосредованным протеинтирозинкиназой 2 (PTK2B), а также истощением ферментного субстрата L-аргинина [44]. В условиях нехватки NO компенсаторно активизируются индуцируемая NO-синтаза (iNOS) и нейрональная NO-синтаза (nNOS), катализирующие синтез NO в чрезмерных концентрациях. Далее NO вступает в реакцию с супероксид-анионом с образованием цитотоксического пероксинитрита, источником которого служит дыхательная цепь митохондрий [45]. Согласно литературным данным, реакция эндотелия на окислительный стресс приводит к дисфункции митохондрий в эндотелиальных клетках, нарушению потенциала мембраны и апоптозу [46].

1.5. Роль нейровоспаления в патогенезе ишемического инсульта

Область иммунобиологии инсульта считается одним из перспективных направлений фундаментальных научных исследований ишемического инсульта. Патогенез заболевания сложен, результатом его является повреждение митохондрий и ДНК, высвобождение АФК, нейровоспаление и апоптоз [47]. В раннем периоде инсульта проявлением иммунного ответа на повреждение мозговой ткани, вызванные локальной ишемией мозга, является нейровоспалительная реакция. Для некроза, наблюдаемого при ишемическом поражении головного мозга, характерно повреждение и повышение проницаемости мембран клетки, в первую очередь митохондрий, в результате чего происходит разрыв плазматической

мембраны, высвобождение продуктов клеточного распада в межклеточное пространство. Нейровоспаление включает в себя ряд последовательных событий, затрагивающих головной мозг, церебральные сосуды, циркулирующую кровь и лимфоидные органы [48]. Ряд исследований подтверждают роль иммунных реакций и воспаления как важных факторов в патогенезе инсульта: было показано, что нейровоспаление, вызванное ишемическим инсультом, активацией внутрисосудистых лейкоцитов и высвобождением провоспалительных медиаторов из поврежденного эндотелия, участвует во всех стадиях инсульта. Местные воспалительные реакции в основном происходят путем активации врожденного и адаптивного иммунитета [49].

После острого инсульта датчики врожденной иммунной системы, такие как толл-подобные рецепторы (TLR) и врожденные иммунные клетки, активируются при ишемии головного мозга, что приводит к усилению воспалительного каскада. Впоследствии активируется адаптивная иммунная система, опосредованная лимфоцитами, которая еще больше усиливает воспалительный ответ [50]. Появляется все больше доказательств, связывающих TLR с вредными воспалительными эффектами ишемии/реперфузионной травмы на фоне ишемического инсульта [51]. К классу факторов, которые регулируют процесс нейровоспаления, относится группа провоспалительных (IL-1, IL-6, IL-8) и противовоспалительных (IL-10, TGF β) интерлейкинов. Недавние исследования продемонстрировали, что ингибирование IL-1 оказывает церебропротекторную активность [52, 53]. Антагонист к IL-1, вводимый пациентам с ишемическим инсультом приводил к снижению воспалительных маркеров, связанных с осложнениями после инсульта и к улучшению функциональной активности нейронов [54-57].

Соответственно, в патогенезе нейровоспаления при инсульте решающая роль отводится сигнальному пути TLR. Они активируются путем высвобождения молекулярных моделей, связанных с DAMP, что приводит к

производству провоспалительных медиаторов [58]. В настоящее время многие современные исследования направлены на изучение недавно открытой роли митохондрий и митохондриальной ДНК в развитии иммунного ответа. Доказано, что мтДНК может участвовать в иммунном ответе, действуя как алармин или DAMP (damage-associated molecular pattern) [59]. Было установлено, что TLR2 и TLR4 особенно важны в этом контексте: предыдущие исследования показали, что эти TLR широко экспрессируются в мозге после ишемии головного мозга и могут усилить повреждение тканей [60]. В клиническом исследовании пациентов с ишемическим инсультом выявлено, что повышенная экспрессия TLR2 и TLR4 независимо связана с плохим функциональным исходом [61]. Известно, что активация рецептора TLR может подавлять эффекты TLR и связанные с ней каскады передачи сигналов, в том числе с участием NF- κ B и MAPK, также было показано, что она ингибирует уровень индуцированных TLR провоспалительных цитокинов, таких как ФНО- α , IL-6 и IL-12 [62, 63].

Результаты различных исследований позволяют сделать вывод, что сохранение функциональной активности митохондрий в условиях ишемии головного мозга может играть важную роль в аспекте подавления нейровоспаления.

1.6. Митохондрии – перспективная мишень для церебропротекторных средств

Митохондрии, являясь энергетическим двигателем клетки, играют ключевую роль в гомеостазе энергии клетки и, таким образом, участвуют в гибели нейронов после ишемического инсульта. Во время ишемии нарушается энергетический баланс из-за снижения кровоснабжения, нарушается синтез аденозинтрифосфата (АТФ). Помимо своей важной роли в генерации энергии, митохондрии участвуют в регуляции различных

механизмов гибели клеток, включая апоптоз. Одним из отличительных признаков ишемического/реперфузионного повреждения является митохондриальная дисфункция, которая вызывает гибель нейронов [64], а сохранение функции митохондрий имеет важное значение для выживания клеток и улучшения неврологического статуса после ишемии. Митохондрии являются связующим звеном многочисленных сигнальных путей, с одной стороны, отвечающих за митохондриальный биогенез, с другой стороны, за апоптоз клетки [65-68]. Следовательно, одной из многообещающих терапевтических стратегий при ишемическом инсульте являются митохондрии [69].

Митохондрии – двухмембранные органеллы сферической или эллипсоидной формы, которые выполняют жизненно важные функции, включая синтез АТФ, регуляцию метаболических процессов клетки, буферизацию кальция и реализацию митохондриального сигнального пути апоптоза [70]. Митохондрии состоят из внутренней и внешней мембран, межмембранного пространства и матрикса [71]. Внутренняя мембрана митохондрий состоит из большого количества складок, образуя кристы, которые увеличивают площадь поверхности мембраны. Кристы – важные части митохондрий, именно в них находятся комплексы дыхательной цепи, в которых происходит окислительное фосфорилирование [72]. Внутренняя и внешняя мембраны митохондрий имеют разную проницаемость. Внутренняя мембрана менее проницаема для ионов и малых молекул, чем внешняя, благодаря чему эффективно отделяет матрикс от цитоплазмы, это необходимо для выполнения функций митохондрий. Митохондриальные мембраны обогащены различными интегральными белками. Например, внешняя мембрана содержит трансмембранные белки – порины, через которые проникают вещества с молекулярной массой до 10 кДа. Внутренняя же мембрана способна пропускать только кислород, углекислый газ и воду [73]. Внутренняя мембрана до 75% состоит из белков, и большая их часть представлена ферментами и белками-

переносчиками [70]. Система окислительно-восстановительных ферментов, встроенных во внутреннюю мембрану митохондрий образуют собой электронно-транспортную цепь (ЭТЦ) или дыхательную цепь. Производство энергии в виде АТФ является основной функцией митохондрий и реализуется в процессе окислительного фосфорилирования, которое функционирует в результате сопряженной работы электрон-транспортной цепи и АТФ-синтазы [74]. ЭТЦ митохондрий рассматривают как систему трансмембранных белков и переносчиков электронов, регулирующих поддержание энергетического баланса. Электроны, собранные в результате катаболических процессов гликолиза, окисления жирных кислот и цикла трикарбоновых кислот, входят в ЭТЦ на внутренней мембране митохондрий. Перенос электронов через ЭТЦ связан с перемещением протонов из митохондриального матрикса. Энергия передается посредством хемиосмоса, в результате чего электрохимический градиент протонов (протонная движущая сила) через мембрану приводит в движение АТФ-синтазу [75]. ЭТЦ включает в себя последовательную и сопряженную работу митохондриальных комплексов (I, II, III и IV) и АТФ-синтазы, которые осуществляют процесс последовательного переноса электронов от NADH и FADH₂ на O₂ (Рисунок 3) [76].

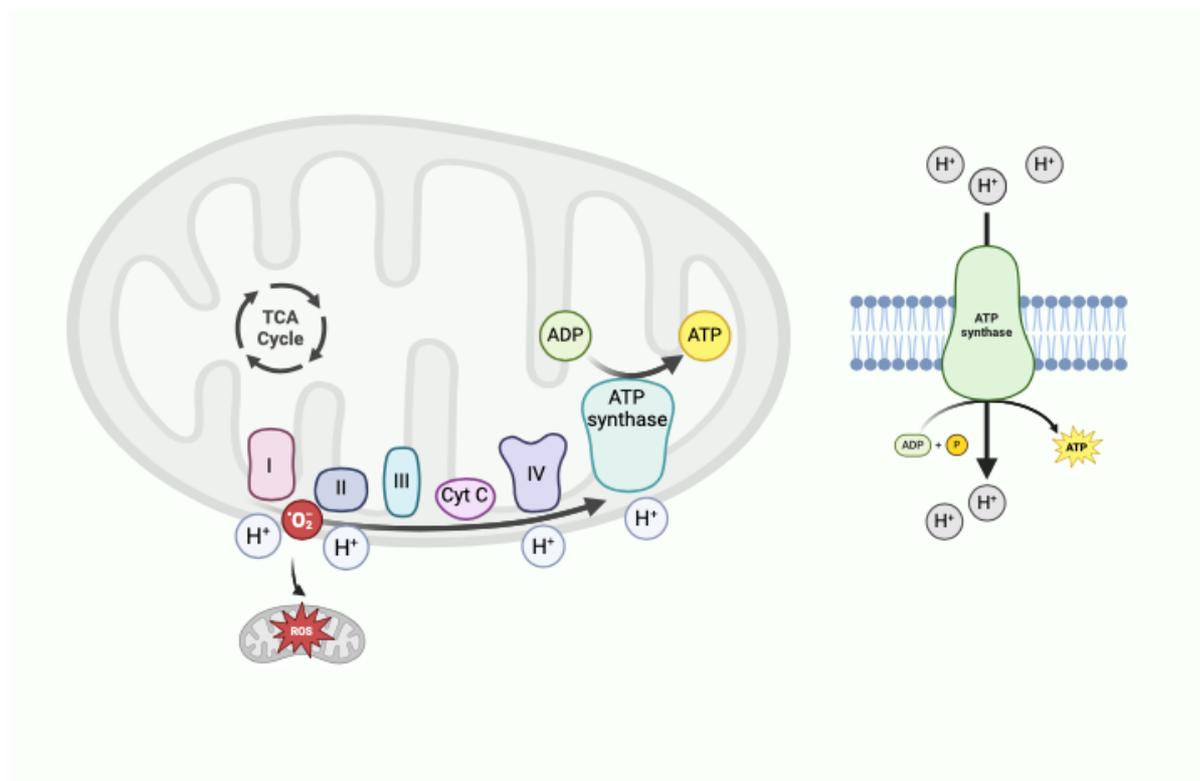


Рисунок 3 – Работа дыхательной цепи митохондрий или электрон транспортной цепи (ЭТЦ)

Примечание: Рисунок создан в программе «Biorender» (biorender.com).

Основным внутриклеточным продуцентом АФК, генерируемых вследствие неполного восстановления кислорода, является митохондриальная цепь переноса электронов [77]. Вследствие этого возникает нарушение интегральности митохондриальной мембраны, повреждение компонентов дыхательной цепи митохондрий и системы фосфорилирования, что, соответственно, оказывает влияние на мембранный потенциал [78-80]. Возникающие изменения мембранного потенциала обуславливают формирование неспецифических мембранных пор, набухание митохондрий, высвобождение проапоптотических факторов, вызывают нарушение кальциевого гомеостаза клетки, что играет ключевую роль в процессах гибели клетки, которые могут протекать по двум путям: апоптотическому и некротическому пути. Апоптоз с участием митохондрий является одним из каскадных событий, которое следует за метаболическими изменениями во время инсульта. Цитохром с и другие митохондриальные белки, которые высвобождаются в цитозоль из межмембранной оболочки,

являются центральными для внутреннего пути апоптоза [79]. На этой фазе цитохром с взаимодействует с белковым кофактором Араf-1 и прокаспазой-9 с образованием апоптосомы, каспазы-3 и других каспаз, которые активируются для протеолиза каспазозависимой ДНКазы, что приводит к межнуклеосомной фрагментации ДНК [81]. Зависимые от каспаз формы апоптоза тесно регулируются апоптоз-индуцируемым ферментом (АИФ), флавопротеином, локализованным в митохондриях, который может высвободиться из внутренней мембраны, чтобы запустить апоптоз после проникновения через внешнюю мембрану [82]. Этот процесс также может привести к деградации ДНК, в которой участвуют другие белки, включая циклофилин А, прокаспазу-9 и эндонуклеазу G [83, 84].

Кроме прямого повреждающего действия АФК на клеточные структуры важно отметить последующие возникающие механизмы, индуцируемые кислородными радикалами. К таким прежде всего относят увеличение уровня АФК-индуцированного свободного кальция и изменение кальцийзависимых процессов [85, 86]. Накопление чрезмерного АФК сопровождается разрушением многих компонентов антирадикальной защиты, в частности белковой природы, это приводит к дальнейшему повышению уровня свободнорадикальной реакции. И генерируемые внутриклеточно, и проникающие внутрь через мембрану АФК, являются пусковым фактором индукции апоптоза [85]. Возмещение запасов питательных веществ и кислорода во время фазы реперфузии после инсульта повторно активирует митохондриальное аэробное дыхание и приводит к выработке АФК [87]. Генерация АФК может спровоцировать разрушение гематоэнцефалического барьера и усугубить отек мозга [88], с точки зрения патологии это может привести к повреждению белков, перекисному окислению липидов и разрушению ДНК [89].

Важным показателем функционального состояния митохондрий является митохондриальный мембранный потенциал, который представляет собой разность потенциалов, возникающую в результате переноса протонов

на внешнюю сторону внутренней мембраны митохондрий путем прохождения электронов через I, III и IV комплексы ЭТЦ. Митохондриальный мембранный потенциал участвует в осуществлении связи между процессами окисления субстрата и аккумуляции энергии в виде макроэргических связей молекул АТФ. Величину мембранного потенциала в митохондриях определяет не только работа ЭТЦ, но также проницаемость внутренней мембраны и процесс синтеза АТФ [77].

Значимой фармакологической мишенью также может быть митохондриальная Ca^{2+} - зависимая пора – неизбирательный канал, проходящий через наружную и внутреннюю мембраны митохондрий и регулируемый ионами кальция. Кальций инициирует открытие митохондриальной поры со стороны матрикса, а с наружной стороны, напротив, блокирует ее. Митохондриальная пора в физиологических условиях контролирует баланс уровня Ca^{2+} в цитозоле и митохондриях, обеспечивая гомеостаз клетки [77]. Очевидно, что нарушение этого механизма чревато перегрузкой органел избыточной концентрацией кальция и, следовательно, гиперпродукцией АФК, запуском окислительного стресса и нарушением метаболизма в митохондриях [78]. Митохондриальная пора кроме метаболической и структурной функции, выполняет регуляторную, активируя разрушение клетки, участвуя в запуске апоптоза [90].

В высокоиндуктивном состоянии митохондриальная пора открыта полностью и необратимо, инициируется нарушение тока H^+ , и, как следствие, наблюдается разобщение окислительного фосфорилирования, нарушающее синтез АТФ. В результате деполяризации мембраны происходит нарушение процессов в ЭТЦ митохондрий, синтеза АТФ, деструкции митохондрий и высвобождения проапоптотических белков в цитозоль, наступает гибель клетки [79-80].

Известно, что митохондриальный путь апоптоза включает не только каспазозависимый путь, но и транспорт в ядро клетки растворимых белков и ферментов, участвующих в апоптозе без активации каспаз: эндонуклеазы G и АИФ [81]. Увеличение концентрации АФК в митохондриях, вопреки антиоксидантной системе, приводят к окислительному стрессу, и, впоследствии к открытию неспецифического канала mPTP (permeability transition pore, митохондриальная пора) [82]. Изменение проницаемости мембраны митохондрий участвует как в регуляции апоптоза, так и в гибели клеток при некрозе. Открытие поры митохондриальной поры приводит к потере потенциала митохондриальной мембраны, деполяризации митохондрий, набуханию и переходу веществ между митохондриальным матриксом и цитоплазмой [82]. Было показано, что процесс открытия mPTP является ответом на концентрацию кальция в митохондриях [83]. Перегрузка Ca^{2+} , производство АФК, окисление глутатиона и снижение потенциала митохондриальной мембраны – факторы, которые способствуют повреждению митохондрий [84, 91]. Предположения о том, что ингибирование открытия mPTP может стать новой стратегией в фармакотерапии ишемических состояний, все больше подтверждается новыми исследованиями. Кроме того, регуляция открытия митохондриальной поры позволяет использовать целенаправленный поиск лекарственных веществ, мишенью которых являются митохондрии [92].

Следовательно, можно говорить о том, что инсульт – это состояние многокомпонентного, последовательно-связанного характера, внутри которого многие процессы могут влиять на дальнейший ход заболевания. Окислительный стресс, эндотелиальная дисфункция, метаболические нарушения и некроз мозговой ткани влекут за собой дисфункциональное состояние митохондрий клетки, и, как следствие, апоптоз. Все это позволяет использовать в качестве фармакотерапии комплексный подход к лечению инсульта, а также проводить фармакокоррекцию инсульта различными лекарственными препаратами. Поиск эффективных методов коррекции

энергетических процессов в митохондриях головного мозга является одним из ключевых направлений патогенетической терапии церебральной ишемии.

Таким образом, можно сделать вывод, что на сегодняшний день митохондрии являются одним из перспективных объектов церебропротекции в разработке технологий защиты мозга в условиях ишемии и коррекции их последствий, а также для профилактики. Очевидно, понимание молекулярных механизмов формирования митохондриальной дисфункции в условиях ишемии, а также ее воздействия на клетки, открывает новые перспективы для разработки ЛС для профилактики и/или лечения последствий ишемического инсульта.

1.7. Фармакологическая коррекция ишемического инсульта. Церебропротекторы, как средства, применяемые в клинической терапии цереброваскулярных патологий. Перспективы развития группы церебропротекторов

Своевременная и эффективная реперфузионная терапия является основой лечения острого ишемического инсульта. Системный тромболизис с применением тканевого активатора плазминогена (Алтеплаза) – единственный одобренный во всем мире метод с доказанной эффективностью [93]. Рекомбинантный человеческий тканевый активатор плазминогена стимулирует превращение плазминогена в плазмин. Проявляя эффект фибринолиза, он восстанавливает кровоснабжение закупоренных сосудов и, таким образом, спасает ишемизированную ткань [94]. Однако, тромболитическая терапия имеет недостатки: узкое «терапевтическое окно» (от начала развития клинической симптоматики не должно пройти более 4,5

ч.), а также ряд противопоказаний и осложнений. Эти причины являются основанием для ограничения применения препарата [95].

Однако, кроме тромболитической терапии, в современной фармакологии имеется множество препаратов, которые применяются в разные периоды ишемического инсульта. Эти лекарственные препараты носят общее название «церебропротекторных средств» или также «нейропротекторов» – веществ, способных восстанавливать функцию нейронов. К церебропротекторам относят препараты с разной химической структурой и механизмом действия. Общими мишенями для многих церебропротекторов служат свободные радикалы, эксайтотоксичность, иммунная модуляция и др. Согласно этому можно выделить церебропротекторы с антиоксидантным действием (Цитиколин, Танакан, Мочевая кислота, Эбселен), иммунные модуляторы (Натализумаб, Миноциклин), блокаторы ионных каналов (Верапамил, Нимодипин) (Таблица 1). Помимо перечисленных фармакотерапевтических средств существует большое количество продолжающихся клинических испытаний, в которых рассматриваются статины, иматиниб, дапсон, антагонисты рецепторов интерлейкина-1, NA-1, гипотермия, инфузия инсулина, использование стволовых клеток и моноклональных антител [96].

Таблица 1 – Фармакотерапия ишемического инсульта, препараты с потенциальным церебропротекторным действием

Наименование препарата	Механизм действия
Неринетид [97].	1. Ингибирует белок постсинаптической плотности 95, связывающий NMDAR с проапоптотическими сигнальными путями.
Отаплимастат [98].	1. Подавляет метаболический путь матриксной металлопротеазы. 2. Уменьшает отек головного мозга и внутримозговое кровоизлияние.
Нимодипин [99].	1. Блокирует кальциевые каналы. 2. Антивазоспастическое действие на сосуды головного мозга.

Церебролизин [100].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Подавляет эксайтотоксичность и воспалительный ответ. 2. Ингибирует образование свободных радикалов. 3. Уменьшению отёка головного мозга. 4. Инактивирует процессы апоптоза и некроза.
Гинкго двулопастного листьев экстракт [101-102].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ингибирует фосфодиэстеразу. 2. Антиоксидантный эффект.
Натализумаб [103].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Избирательно ингибирует молекулы адгезии ($\alpha 4$-интегрин).
Цитиколин [104-107].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Антиоксидантное и антирадикальное действие (увеличивает синтез ГП, СОД, подавляет процессы ПОЛ). 2. Снижает эксайтотоксичность. 3. Ингибирует апоптоз. 4. Улучшает энергетику митохондрий. 5. Повышает нейрогенез.
Эбселен [108-109].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Селенорганическое соединение с антиоксидантным действием.
Мочевая кислота [110].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Антиоксидантное действие.
Этилметилгидроксипиридина сукцинат [111-114].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Антиоксидантное и мембранопротекторное действие. 2. Восстанавливает нейромедиаторный баланс. 3. Улучшает функциональное состояние митохондрий.
Ацетилцистеин [115-116].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Антиоксидантное действие.
Активированный протеин С [117].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Антикоагулянтный эффект. 2. Цитопротекторный эффект.
Метформин [118].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Подавляет апоптоз. 2. Антиоксидантное действие. 3. Снижает нейровоспаление.
Миноциклин [119-120].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Противовоспалительное действие. 2. Увеличивает латентный период открытия митохондриальной поры. 3. Подавляет апоптоз.
Диметилфлумарат [121-122].	<ol style="list-style-type: none"> 1. Модулирует воспалительные реакции. 2. Стимулирует антиоксидантные

Исследования последних лет делают акцент на многонаправленное действие церебропротекторных средств, что создает определенные требования к поиску новых потенциальных церебропротекторов. Ряд препаратов из разных фармакологических групп продолжают изучать в клинических исследованиях: мочевая кислота, верапамил, статины, а также стволовые клетки и моноклональные антитела.

Мочевая кислота - промежуточный продукт пуринового обмена, обладает мощным антиоксидантным действием. В доклинических моделях инсульта оказывает церебропротекторные эффекты. Концентрация мочевой кислоты увеличивается на фоне ишемического инсульта, однако, далее наблюдается постепенное снижение ее концентрации. В экспериментальных исследованиях случаи инвалидизации у пациентов, получавших плазминоген и мочевую кислоту наблюдались реже, чем у пациентов, получавших только плазминоген [123].

Верапамил - один из основных представителей недигидропиридиновых блокаторов медленных кальциевых каналов, обладает антиаритмической, антиангинальной и антигипертензивной активностью. Слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование показало, что внутриартериальное введение верапамила пациентам после тромбэктомии снижало риск внутричерепного кровоизлияния или других побочных эффектов и/или послеоперационных осложнений [124].

Терапия статинами оказывала положительные эффекты как для первичной, так и для вторичной профилактики инсульта. Кроме того, статины также сокращали время восстановления и выживаемость пациентов в течение первой недели после ишемического инсульта. Было показано, что применение статинов после ишемического инсульта улучшало метаболические и когнитивные функции пациентов, тогда как прекращение

терапии приводило к противоположному результату. Однако, исследование, проведенное в Японии, свидетельствует, что назначение статинов пациентам с ИИ и дислипидемией показало незначительную разницу и почти одинаковый результат, как при раннем (в течение 24 ч), так и при отсроченном (на 7-й день от начала ИИ) применении препаратов [125-126].

Использование стволовых клеток в терапии больных с ишемическим инсультом заключается в замене поврежденной нейрональной ткани новыми здоровыми клетками. В последние годы эксперименты доказали, что стволовые клетки эффективны при лечении ишемического инсульта, и имеют мало побочных эффектов. Механизм, лежащий в основе этого, включает противовоспалительное, антиапоптозное, антиоксидантное действие, защиту гематоэнцефалического барьера, а также стимулирование ангиогенеза и нейрогенеза [127].

Иммунотерапию рассматривают как новую стратегию терапии ишемического инсульта, в этом направлении активно изучается применение моноклональных антител на фоне ишемического инсульта. Эндогенные воспалительные молекулы (хемокины, цитокины и молекулы клеточной адгезии) являются мишенью для действия моноклональных антител, которые ингибируют воспалительные пути и каскады. Вместе с увеличением терапевтического окна применение моноклональных антител также подавляет воспаление после острого ишемического инсульта и уменьшает объем инфаркта головного мозга. Однако, пока эксперименты были успешными только на животных моделях, исследования продолжаются [128].

Несмотря на обширный список препаратов с церебропротекторной активностью, препаратов с доказанной эффективностью не так много. Это позволяет говорить об актуальности поиска веществ, обладающих церебропротективным действием.

В последние годы большую популярность набирают вещества растительного происхождения, которые всегда были предметом интереса в

научном сообществе. Это объясняется множеством достоинств, присущих соединениям растительного происхождения перед синтетическими веществами. К ним относят минимальные побочные эффекты, большую широту терапевтического действия, возможность комбинированного применения, накопительный эффект, а также низкую токсичность [129-131]. Средства растительного происхождения используются не только в комплексной терапии многих заболеваний, но и в качестве профилактических средств в превентивной медицине. Известно, что полифенольные соединения благодаря своей химической структуре обладают антиоксидантными свойствами, что делает данные растительные вещества интересным предметом исследования в рамках поиска новых терапевтических средств. В настоящее время известно около 8000 полифенольных соединений. В зависимости от количества содержащихся в них фенольных колец, их можно разделить на четыре основных подкласса: флавоноиды, включая флавонолы, флавоны, изофлавоны, флаваноны, антоцианидины и флаванолы; подкласс фенольных кислот, который делится на соединения, полученные из гидроксibenзойных кислот, таких как галловая кислота, и соединения, полученные из гидроксикоричной кислоты, такие как кофейная, феруловая и кумаровая кислота; стильбены и лигнаны [132-134].

Отдельный класс соединений составляют флавоноиды, антоцианы, производные коричной кислоты – вещества с обширным спектром фармакологического действия, среди которых антиоксидантное, противовоспалительное, церебропротекторное, эндотелиопротективное и метаболическое [135-140]. У многих флавоноидов и фенольных соединений были доказаны их заметные противовоспалительные и иммуностимулирующие действия [141-142]. Так, к примеру, гесперидин и диосмин были отмечены как флавоноиды, обладающие противовоспалительным действием, кроме того, известно, что диосмин

снижает неврологический дефицит и отек головного мозга в условиях ишемического повреждения мозга [143, 144].

Известно, что куркумин в дозе 100 мг/кг подавляет окислительный стресс, проявляет церебропротекторное действие в условиях очаговой ишемии, предотвращает повреждение микрососудистых эндотелиальных клеток мозга крыс, а также снижает производство АФК [145].

Антоциан мальвидин защищает эндотелиальные клетки от повреждений, вызванных пероксинитритом, противодействуя образованию АФК, блокирует апоптотические внутриклеточные сигнальные механизмы, опосредованные митохондриями [146].

Исследования, проведенные учеными из Индии, показали, что растительный флавоноид хризин проявляет множество фармакологических эффектов: антиоксидантный, противовоспалительный, а также церебропротекторный [147].

Теафлавин оказал защитный эффект от почечной травмы ишемии/реперфузии, ингибируя окислительный стресс и апоптоз путем активации пути Nrf2, а также коррекции дисфункции митохондрий.

Для фенилпропаноидов, из которых наиболее известны оксикоричная, кофейная, феруловая и синаповая кислоты, характерны адаптогенные, тонизирующие, ноотропные, анксиолитические, антидепрессантные и иммуномодулирующие свойства, что также делает эти соединения актуальными для исследования [148]. Коричной кислоте, а также её производным, присущи церебропротекторные, антиоксидантные и противовоспалительные свойства, которые на сегодняшний день исследуются на различных патологиях [149].

Результаты исследования учёных Qu Y. и др. (2022 год) показали, что применение галловой кислоты значительно снизило степень отека головного мозга, привело к повышению целостности ГЭБ, а также к улучшению показателей неврологического дефицита у мышей в условиях ишемического повреждения [150].

Изучение хризантемина в условиях эндотелиальной дисфункции, воспроизведенной на кроликах, показало, что соединение способствовало улучшению гемодинамики, понижению уровня липидов в крови, подавляло производство провоспалительных цитокинов, в условиях *in vitro* хризантемин подавлял апоптоз [151].

Исследования показали, что гиперозид обладает широким спектром активности, включая противоопухолевую, противовоспалительную, антибактериальную, противовирусную, что позволяет сегодня более детально изучать данное вещество [152]. Отдельный интерес представляет исследование влияния гиперозида на состояние крыс на модели болезни Паркинсона, в котором было показано, что флавоноид, влияя на аутофагию, подавлял апоптоз и улучшал поведенческие функции животных [153].

На модели болезни Альцгеймера было выявлено, что глицитеин способствует снижению когнитивного дефицита и защищает нейроны головного мозга от повреждения [154].

Сорбиновая кислота используется во всем мире в качестве пищевой добавки. Сегодня эффекты сорбиновой кислоты активно изучаются, считается, что ей присущи антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства [155].

К наиболее распространенным антоцианам относят мальвидин, пеонидин, цианидин, пеларгонидин, петунидин и дельфинидин. Из них наиболее известным антоцианом является мальвидин (Рисунок 4). Мальвидин (3,5,7-тригидрокси-2-(4-гидрокси-3,5-диметоксифенил)хромений) присутствует в различных фруктах, ягодах, овощах и на него приходится примерно 7% распределения пигмента в съедобных частях растений. Мальвидин обычно связан с различными сахарными остатками в положении С-3. Эта молекула имеет четыре донора водородных связей, что делает ее мощным разобшителем активных форм кислорода [156]. Мальвидин и его гликозиды представляют собой перспективное соединение

благодаря своим антиоксидантным, противовоспалительным, церебропротекторным свойствам [157].

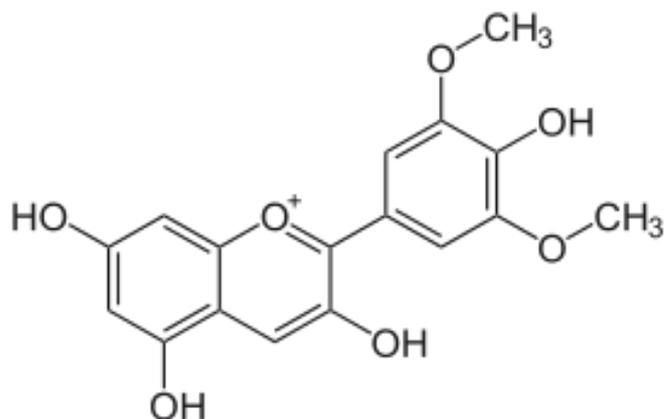


Рисунок 4 – Структура мальвидина

Антоцианы обладают способностью нейтрализовать активные формы кислорода и азота. Уникальная структура катиона флавилия объясняет антиоксидантные свойства антоцианов [158]. Эти соединения могут нейтрализовать реактивные радикалы с помощью реакции переноса одного электрона или с помощью механизма переноса атомов водорода [159]. Существует ряд перспективных актуальных исследований, подтверждающих потенциальное терапевтическое и профилактическое действие мальвидина в условиях различных патологических состояний. Исследование влияния мальвидина *in vivo* на крысах с патологией почек, вызванное ишемией и реперфузией, показало повышение активности антиоксидантных ферментов, таких как каталаза и супероксиддисмутаза, а также снижение уровня окислительного стресс-маркера малонового диальдегида по сравнению с контрольной группой. Основываясь на этих результатах, авторы предполагают, что потребление мальвидина может оказывать защитное действие против острого повреждения почек, вызванного реперфузией, отчасти за счет снижения окислительного стресса в тканях почек [159].

Некоторые исследования продемонстрировали ингибирующее действие мальвидина на путь NF-κB, который играет решающую роль в регулировании воспалительного ответа. Сигнальный путь NF-κB активируется различными воспалительными медиаторами, такими как TNF-α или IL-1 [160].

Несколько исследований показали, что мальвидин и его гликозиды оказывают ингибирующее действие на класс митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК). В нормальных физиологических условиях сигнальные пути МАРК играют решающую роль в различных процессах, включая пролиферацию клеток, выживание и дифференцировку. Эти пути активируются при окислительном стрессе, воспалении, далее МАРК перемещаются в ядро и фосфорилируют соответствующие факторы транскрипции, тем самым регулируя экспрессию генов [161].

Таким образом, мальвидин и его гликозиды проявляют мощную антиоксидантную активность, отдавая электрон или атом водорода для нейтрализации свободных радикалов, а также ингибируют ферменты, участвующие в производстве АФК, повышают антиоксидантную защиту посредством увеличения концентрации глутатионпероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы. Кроме того, исследования показали, что мальвидин и его гликозиды могут ингибировать экспрессию фермента ксантиноксидазы.

1.8. Противовоспалительные свойства мальвидина и его гликозидов

Свободные радикалы могут вызывать повреждение клеточных и тканевых компонентов путем окисления нуклеиновых кислот, белков и липидов, что приводит к воспалению. Исследования показали, что увеличение производства АФК приводит к образованию большего количества провоспалительных маркеров. Кроме того, экспериментальные

данные показали, что АФК активирует путь NF- κ B, который вызывает транскрипционную активацию генов, связанных с воспалительным ответом [162].

Отдельный интерес занимают исследования, посвященные изучению противовоспалительных свойств мальвидина-3-глюкозида, вызванных инфламмасомой *in vitro* на мышинной модели хронического непредсказуемого стресса. Результаты показали, что мальвидин-3-глюкозид нацелен на инфламмосомы NLRP3, NLRC4 и AIM2, что приводит к снижению уровня белка каспаза-1 и IL-1 в мышинной первичной кортикальной микроглии и мозге. Кроме того, на мышинных моделях было обнаружено, что мальвидин ингибирует АФК -зависимую активацию воспаления NLRP3, что приводит к снижению секреции провоспалительных цитокинов в сыворотке крови и апоптоза, опосредованного митохондриальным путем. Мальвидин также повысил уровень белка Bcl-2, одновременно снижая уровни Bax, цитохрома C и каспазы-3. Исследование показало, что мальвидин был нацелен на путь AMPK- α /UCP2, который восстановил митохондриальную функцию и снизил накопление АФК, что в итоге привело к ингибированию активации инфламмосомы NLRP3 и митохондриального апоптоза АФК-зависимым способом [163].

Различные эксперименты предоставили доказательства того, что мальвидин и его гликозиды могут модулировать различные медиаторы воспаления, включая протеинкиназы, факторы транскрипции (AP-1 и NF- κ B), ферменты (iNOS и COX-2) и цитокины (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) которые, как известно, играют центральную роль в процессе воспаления. Эти результаты свидетельствуют о том, что мальвидин и его гликозиды могут служить потенциальными терапевтическими веществами при воспалительных заболеваниях.

1.9. Церебропротекторные эффекты мальвидина и его производных

Есть данные о том, что мальвидин и его гликозиды, могут оказывать положительное влияние при нейродегенеративных заболеваниях [164, 165].

Потребление антоциана черники (20 мг/кг/сутки) активизирует астроциты и микроглию у мышей. Антоцианины улучшают обучение и память, что было подтверждено водным лабиринтом Морриса, новым тестированием на распознавание объектов, пассивное избегание и тестами открытого поля [164].

В исследовании Zhao P. (2023 год) и др. изучалось влияние мальвидина на клетки микроглии мышей, было показано, что он предотвращает митохондриальную дисфункцию и накопление АФК, снижает перекисное окисление липидов и повышает активность антиоксидантных ферментов в головном мозге [166].

Giliani S.J. и др. (2022 год) провели исследование по изучению антиоксидантных свойств мальвидина против нейротоксичности, вызванной хлоридом алюминия у крыс. После 61 дня лечения мозг крыс был обследован с помощью нейрохимического анализа. Результаты свидетельствуют, что мальвидин улучшил поведенческие параметры, на которые влияет хлорид алюминия. Биохимический анализ показал, что пероральное введение мальвидина оказывает церебропротекторное действие посредством регуляции уровня антиоксидантов и нейровоспаления у крыс, подвергшихся воздействию алюминия хлорида. Эти результаты свидетельствуют о том, что мальвидин обладает антиоксидантной активностью, ингибируя ацетилхолинэстеразу и регулируя окислительный стресс в нейронах [167].

Kang H.J. и др. (2021 год) изучили защитные эффекты мальвидина против повреждений, вызванных двусторонней окклюзией общей сонной артерии и реперфузией в сосудах микроциркуляторного русла крыс.

Окклюзия и реперфузия вызвали уменьшение диаметра артериоларов у крыс, увеличение проницаемости сосудов и адгезии лейкоцитов, снижение капиллярной перфузии и увеличение скорости оседания эритроцитов, а также заметное повреждение нейронов и генерацию АФК, сосудистые эффекты мальвидина были опосредованы активацией eNOS [169].

В другом исследовании изучались эффекты мальвидина и других антоцианов, полученного из вида *Vaccinium* посредством длительного добавления порошка черники в рацион питания пожилых людей с когнитивными нарушениями [168]. В исследовании приняли участие 94 участника, которые получали 25 г порошка черники в день в течение 24 недель. У группы, которая получала порошок черники, отмечено улучшение когнитивных функций и памяти [169]. Эти результаты демонстрируют потенциальное благотворное влияние добавок антоцианов на людей с деменцией.

1.10. Потенциальное применение мальвидина и его гликозидов

Учитывая широкий спектр фармакологической активности мальвидина и его гликозидов, есть значительные перспективы их использования в качестве биологически активных добавок. Применение фруктового сока участниками эксперимента (общее содержание антоцианов 274 мг/л) показало, что фруктовый сок продемонстрировал антиоксидантное действие. Потребление богатого антоцианом фруктового сока также привело к значительному снижению жировых отложений, повышению активности СОД, а также снижению уровня липопротеинов низкой плотности и общего холестерина [170].

Группа ученых провела исследование, целью которого было изучить влияние соков, богатых антоцианами, на организм. Участникам давали 330 мл напитка (сок и смузи из черники). После приема напитков. Содержащих

антоцианы, у испытуемых наблюдали значительное увеличение активности СОД и каталазы в плазме, что указывает на усиление антиоксидантной защиты. Кроме того, концентрация малонового диальдегида, маркера окислительного стресса, снизилась как в плазме, так и в моче после употребления напитков, богатых антоцианами. Употребление виноградного сока из красного сорта ягод *Конкорд* и сока из ягод черники способствовало улучшению когнитивных функций у пожилых людей с ранним ухудшением памяти. Нейрокогнитивная польза антоцианинов также была подтверждена функциональной магнитно-резонансной томографией в исследовании, в котором добавление черничной диеты оказывало положительное влияние на память. Улучшение показателей внимания/рабочей памяти также наблюдалось у людей, переживающих легкое снижение когнитивных способностей, потребляющих столовый виноград два раза в день. Кроме того, антоцианы улучшают кровообращение головного мозга, улучшают когнитивные функции у здоровых пожилых людей [164, 171].

Эти результаты свидетельствуют о том, что богатые антоцианами напитки могут защитить организм от окислительного стресса, который является ключевым фактором развития цереброваскулярных заболеваний.

Вышеупомянутые исследования свидетельствуют о значительном церебропротекторном действии мальвидина и его гликозидов, которые могут быть обусловлены их антиоксидантным и противовоспалительным механизмами. Добавление продуктов, содержащих мальвидин, в рацион питания может способствовать профилактике нейродегенеративных и неврологических заболеваний. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования, чтобы полностью понять точные механизмы, с помощью которых мальвидин и его гликозиды, могут обладать церебропротекторными свойствами.

Согласно вышеописанным исследованиям о мальвидине и иных соединениях растительного происхождения, встал вопрос о проведении фармакологического скрининга в ряду данных соединений (мальвидин,

хризин, хризантемин, куркумин, диосмин, геспердин, сорбиновая кислота, гиперозид, глицитеин, коричная кислота, галловая кислота, теафлавин) для последующего изучения особенностей фармакологических свойств мальвидина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Лабораторные животные

Эксперимент проведен на 392 крысах-самцах линии Wistar, массой 220–240 граммов. Животные получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Всеволожский район, Ленинградская область). Крысы содержались в виварии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ.

Лабораторных крыс содержали в стандартных условиях вивария при температуре воздуха $22\pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности $65\pm 5\%$, при естественной смене свето-темнового режима со свободным доступом к воде и еде. Экспериментальные крысы были помещены в макролоновые клетки с решетчатыми стальными крышками и специальным углублением для корма. В качестве подстилочного материала были использованы сухие нехвойные автоклавированные опилки. Кормление проводили в фиксированное время. Водопроводная вода подавалась в питьевых стандартных емкостях (250 мл). Ежедневно менялись клетки, поилки и подстил для крыс.

Все процедуры с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями Европейской директивы о защите животных 2010/63/ЕС, и инструкцией ARRIVE, в также Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

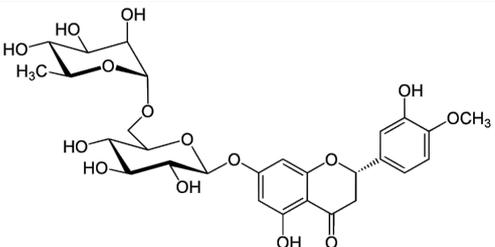
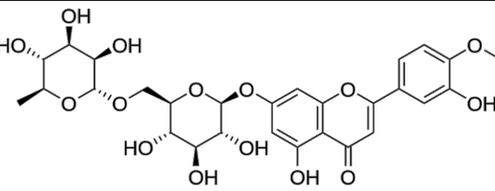
Данное исследование проводилось согласно следующим нормативным документам: [ГОСТ Р 33044–2014] «Принципы надлежащей лабораторной практики» (введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. №1700-ст.); Руководство по проведению доклинических исследований

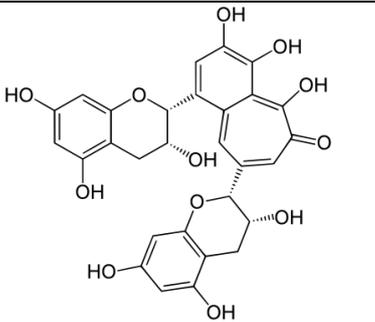
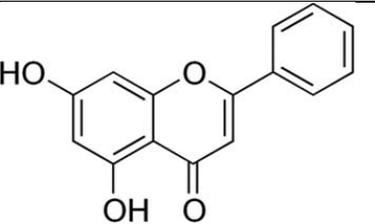
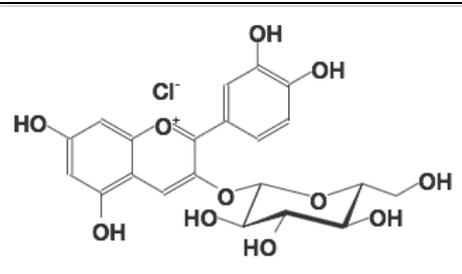
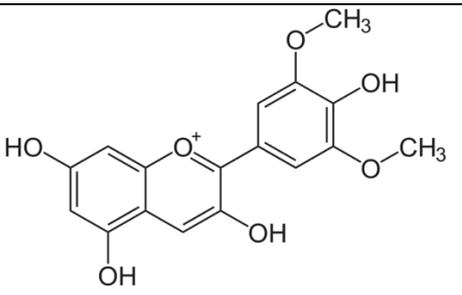
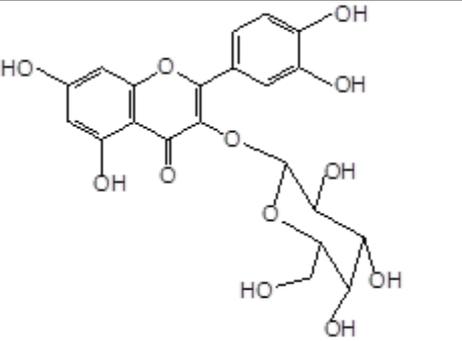
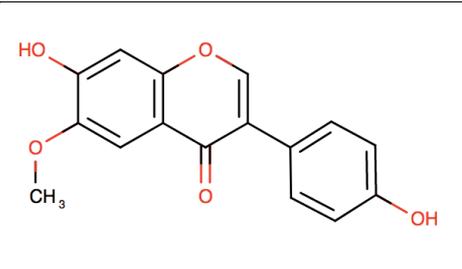
лекарственных средств под ред. А.Н. Миронова. В двух частях. – М.: Грифф-и-К.,2012.

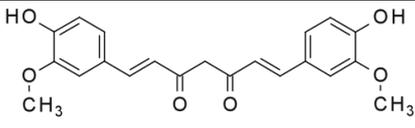
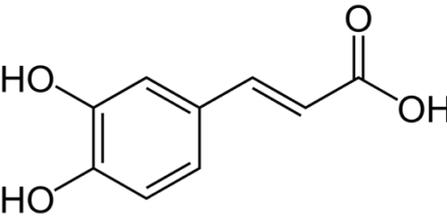
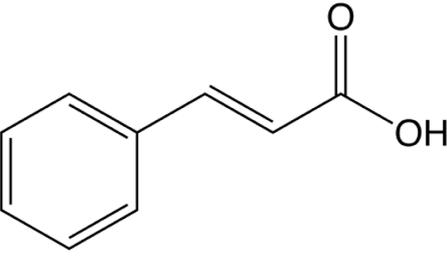
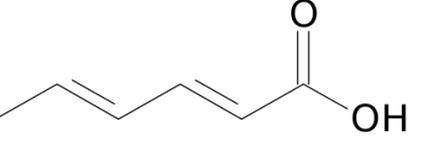
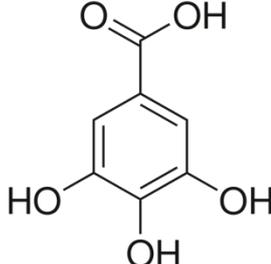
2.2. Характеристика исследуемых соединений

В работе изучена коррекция митохондриальной дисфункции флавоноидами и производными коричной кислоты в условиях ишемии головного мозга. Все исследуемые соединения (флавоноиды: гесперидин, диосмин, теафлавин, хризин, хризантемин, мальвидин, гиперозид, глицитеин, куркумин; производные коричной кислоты: кофейная кислота, галловая кислота, сорбиновая кислота, а также коричная кислота) представляли собой коммерческие субстанции производства компании Hunan Warrant Pharmaceutical (Китай). Исследуемые соединения вводились животным *per os*.

Таблица 2 – Характеристика исследуемых соединений

Наименование	Химическая формула	Молекулярная масса; г/моль
Коммерческие субстанции производства Hunan Warrant Pharmaceutical (Китай)		
<i>Гесперидин</i> 90%		610,56
<i>Диосмин</i> 90%		608,545

<p><i>Теафлавин</i> 90%</p>		<p>564,49</p>
<p><i>Хризин</i> 98%</p>		<p>254,241</p>
<p><i>Хризантемин</i> 90%</p>		<p>484,841</p>
<p><i>Мальвидин</i> 99%</p>		<p>331,3</p>
<p><i>Гиперозид</i> 90%</p>		<p>464,379</p>
<p><i>Глицитеин</i> 90%</p>		<p>284,267</p>

<p><i>Куркумин</i> 90%</p>		<p>368,38</p>
Производные коричной кислоты		
<p><i>Кофейная кислота</i> 98%</p>		<p>180,16</p>
<p><i>Коричная кислота</i> 98%</p>		<p>148,17</p>
<p><i>Сорбиновая кислота</i> 99%</p>		<p>112,13</p>
<p><i>Галловая кислота</i> 98%</p>		<p>170,12</p>

2.3. Дизайн исследования

Диссертационное исследование включало в себя несколько этапов:

1. Проведение фармакологического скрининга, с целью выявления наиболее эффективного церебропротективного соединения в ряду исследуемых объектов.
2. Выявление наиболее эффективной дозы соединения-лидера.
3. Исследование потенциального механизма действия соединения-лидера (изучение активности ферментов антиоксидантной защиты, оценка эндотелиопротекторного, противовоспалительного действия, оценка

влияния соединения-лидера на митохондриальную дисфункцию в условиях фокальной ишемии головного мозга крыс).

В рамках фармакологического скрининга все исследуемые соединения вводились интрагастрально в дозе 100 мг/кг [171, 172] через 3 часа с момента воспроизведения ишемии и ежедневно на протяжении 3-х дней (Рисунок 5). Все регистрируемые показатели определяли спустя 72 часа после моделирования фокальной ишемии головного мозга.

В качестве референтных препаратов в работе были использованы: этилметилгидроксипиридина сукцинат (Мексидол, 100 мг/кг, ООО «НПК «Фармасофт», Россия) [113], ацетилцистеин (АЦЦ, 150 мг/кг, Линдофарм ГмбХ, Германия) [173]. Основанием для выбора данных препаратов сравнения послужило их антиоксидантное действие. Последние исследования подтверждают положительное влияние мексидола на церебральный митохондриогенез в условиях ишемии головного мозга, что обусловлено структурой препарата, в частности, молекулой сукцината [113]. С середины прошлого столетия ацетилцистеин активно изучается, как мощное антиоксидантное средство. Известно, что ацетилцистеин, обладая антиоксидантным и противовоспалительным действием, оказывает терапевтические эффекты при различных нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона и инсульт [174]. В настоящее время проводится ряд доклинических и клинических исследований церебропротекторных свойств ацетилцистеина [115, 116]. Вышеперечисленное послужило критерием для включения данных препаратов в исследовательскую работу.

При проведении фармакологического скрининга было сформировано 17 групп (n=6). Из них 13 групп, которым вводили экспериментальные соединения (производные коричной кислоты и флавоноидов), 2 группы, получавшие препараты сравнения (Мексидол, АЦЦ), группа негативного контроля и ложнооперированная группа, соответственно. Всем особям в группах, кроме ЛО, воспроизводили фокальную ишемию головного мозга.

Спустя 3 часа с момента воспроизведения ишемии и ежедневно на протяжении 3-х дней осуществляли фармакологическую коррекцию (кроме группы ЛО). Через 72 часа после моделирования ишемии во всех группах осуществляли регистрацию показателей (Рисунок 5).

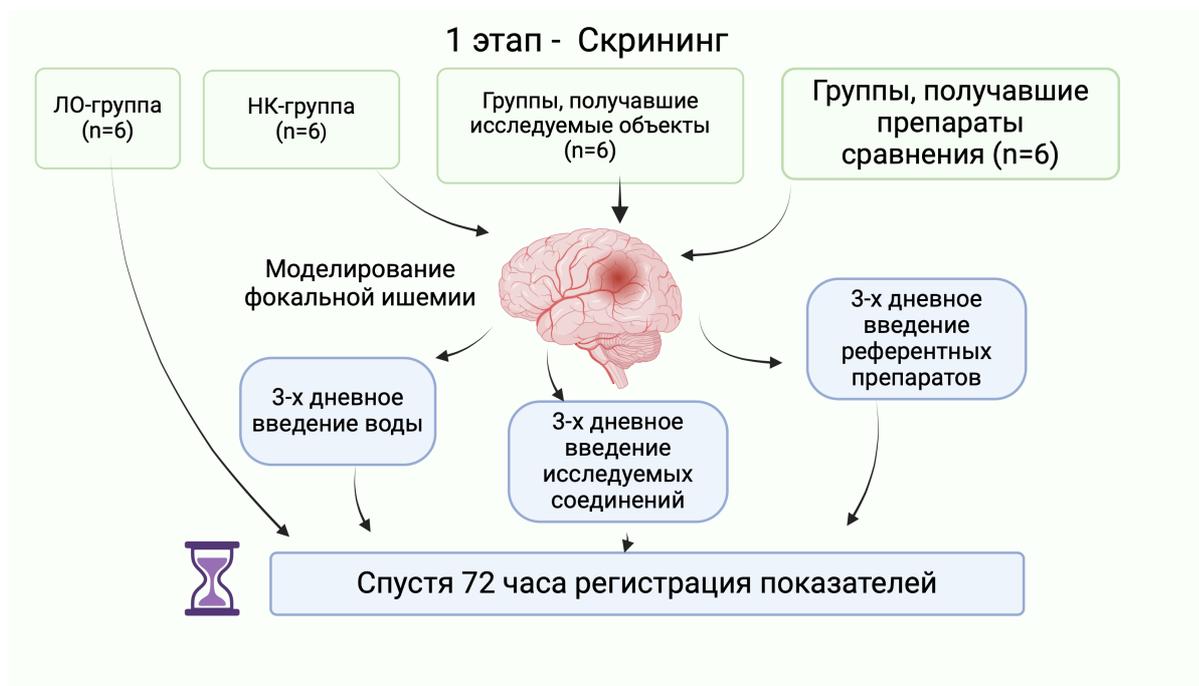


Рисунок 5 – Дизайн этапа фармакологического скрининга

Примечание: ЛО – группа ложнооперированных крыс, которую подвергали всем операционным манипуляциям, кроме термокоагуляции средней мозговой артерии

НК – группа крыс негативного контроля, которой воспроизводили фокальную ишемию головного мозга, данная группа не получала фармакологической поддержки

Группы, получавшие исследуемые соединения – в совокупности это 13 групп (n=6), каждой из которых вводили исследуемое вещество

Группы, получавшие препараты сравнения – две различные группы животных, которые получали препараты сравнения (n=6).

На стадии фармакологического скрининга был проведен ряд экспериментов, по результатам которых было выбрано соединение-лидер. Оценивали влияние исследуемых объектов на поведенческий, неврологический и сенсомоторный дефицит в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «ТЭИ», «УРПИ». Изучалось влияние всех экспериментальных соединений на размер зоны некроза и степень отека головного мозга, на концентрацию лактата, пирувата в сыворотке крови и гомоцистеина в плазме крови.

При определении зависимости «доза-эффект» с целью выбора наиболее эффективной дозы соединения-лидера было изучено его влияние на объем зоны некроза ткани головного мозга и концентрацию лактата, пирувата и гомоцистеина (Рисунок 6).

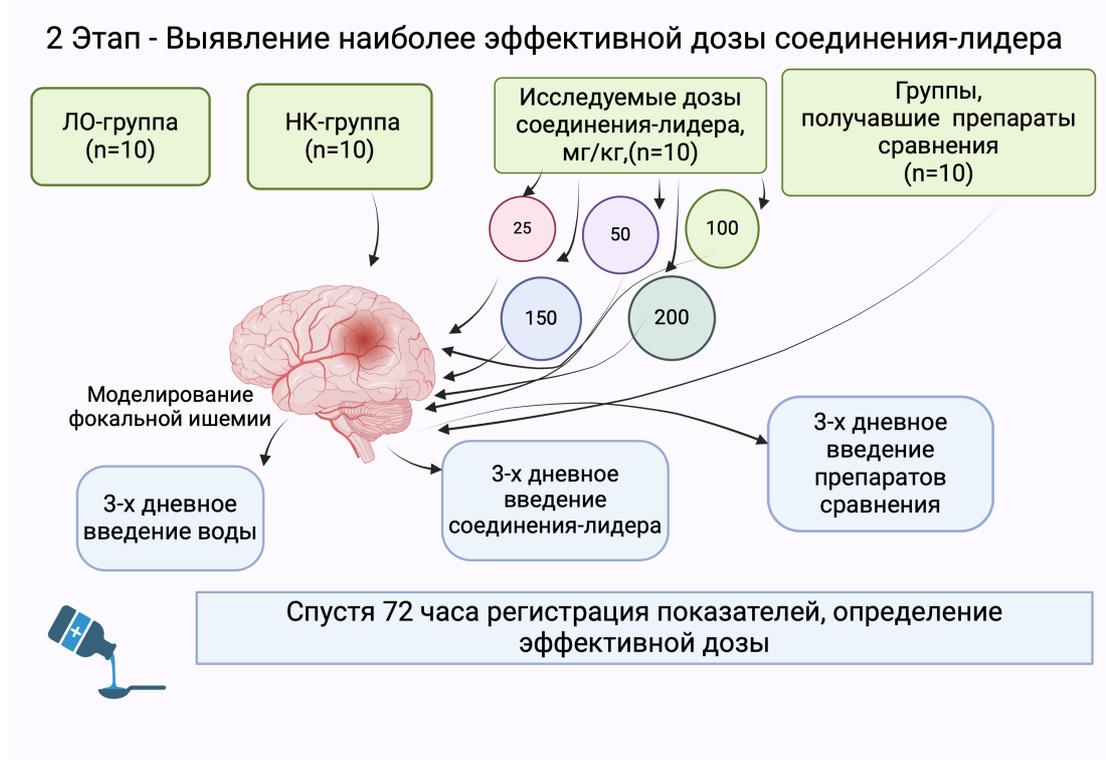


Рисунок 6 – Дизайн этапа выявления наиболее эффективной дозы соединения-лидера

Примечание: ЛО – группа ложнооперированных крыс, которую подвергали всем операционным манипуляциям, кроме термокоагуляции средней мозговой артерии

НК – группа крыс негативного контроля, которой воспроизводили фокальную ишемию головного мозга, данная группа не получала фармакологической поддержки

Группы, получавшие разные дозы соединения-лидера – в совокупности это 5 групп (n=10), каждой из которых вводили исследуемые вещества

Группы, получавшие препараты сравнения – две различные группы животных, которые получали препараты сравнения (n=10).

На данном этапе экспериментальной работы было сформировано 9 групп (n=10), из них пять – группы, получавшие соединение-лидер в различных дозах (25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг, 200 мг/кг). Фокальную ишемию головного мозга воспроизводили во всех группах, кроме ЛО, соответственно. Спустя 3 часа с момента воспроизведения ишемии и ежедневно на протяжении 3-х дней осуществляли

фармакологическую коррекцию (кроме группы ЛО). Через 72 часа после моделирования ишемии во всех группах осуществляли регистрацию показателей (Рисунок 6).

На этапе углубленного изучения соединения-лидера был проведен блок экспериментов, на основе которых был выяснен его потенциальный механизм действия. Изучалось влияние соединения-лидера на вазодилатирующую и антиагрегационную функцию эндотелия, активность ферментов антиоксидантной защиты, изучались противовоспалительные свойства соединения, а также влияние на митохондриальную функцию в условиях фокальной церебральной ишемии (Рисунок 7).

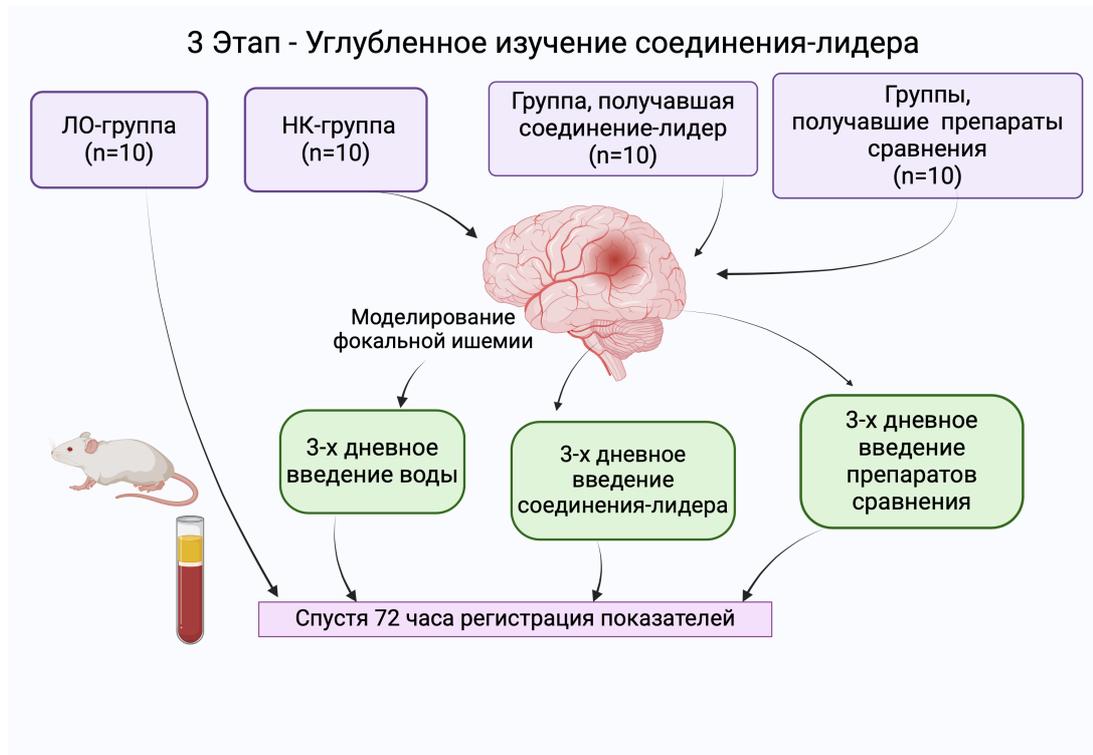


Рисунок 7 – Дизайн исследования, углубленное изучение соединения-лидера

Примечание: ЛО – группа ложнооперированных крыс, которую подвергали всем операционным манипуляциям, кроме термокоагуляции средней мозговой артерии

НК – группа крыс негативного контроля, которой воспроизводили фокальную ишемию головного мозга, данная группа не получала фармакологической поддержки

Группа, получавшая соединение-лидер – в совокупности это 1 группа (n=10), каждой из которых вводили исследуемые вещества

Группы, получавшие препараты сравнения – две различные группы животных, которые получали препараты сравнения (n=10).

На третьем этапе, посвященном изучению потенциальных механизмов действия, было сформировано пять групп (n=10). Во всех группах, кроме ЛО воспроизводили фокальную ишемию головного мозга. Спустя 3 часа с момента воспроизведения ишемии и ежедневно на протяжении 3-х дней осуществляли фармакологическую коррекцию (кроме группы ЛО). Через 72 часа после моделирования ишемии во всех группах осуществляли регистрацию показателей (Рисунок 7). Углубленное изучение соединения-лидера включало:

- оценку эндотелиопротекторного действия (вазодилатирующая, агрегационная активность);
- изучение влияния соединения-лидера на активность антиоксидантных ферментов (СОД, ГП, каталазы);
- изучение влияния соединения-лидера на провоспалительные цитокины (ФНО- α , ИЛ-6);
- изучение влияния соединения-лидера на митохондриальную функцию (общая респирометрическая функция, процессы гликолиза, активность митохондриальных комплексов; латентное время открытия митохондриальной поры и митохондриального потенциала, а также внутриклеточное содержание Ca^{2+}).

2.4. Модель церебральной ишемии

Для воспроизведения фокальной ишемии головного мозга крысам была выбрана модель необратимой термокоагуляции правой средней мозговой артерии. Для введения крыс в наркоз применялся хлоралгидрат (350 мг/кг). У крыс справа и ниже глаза выстригали участок около 2 см², делали надрез на коже, аккуратно разделяли мышцы, далее удаляли отросток скуловой кости. С помощью специального бора над зоной перекрестия обонятельного тракта и средней мозговой артерии высверливали трепанационное отверстие. После производили коагуляцию,

пережигая среднюю мозговую артерию под местом пересечения обонятельного тракта и средней мозговой артерии, соответственно. Поврежденные ткани восстанавливали, также осуществлялась репозиция костных фрагментов. В качестве антисептического средства для обработки раны использовали 5% раствор йода. Сразу после операции и до пробуждения крысы находились под согревающей лампой. После операции животных переводили на мягкормовую диету [175-177].

2.5. Методы оценки церебропротекторной активности

2.5.1 Методы определения поведенческого и сенсомоторного дефицита

Тест «Открытое поле» (ОП)

Оценку ориентировочно-исследовательского поведения осуществляли у всех экспериментальных животных до и после воспроизведения фокальной церебральной ишемии в тесте «Открытое поле» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия). Установка представлена серой круглой ареной диаметром 97 см, разделенной на сектора, с высотой бортов 42 см и отверстиями для заглядывания (диаметр 2 см). Каждое животное по одному помещали в центр поля и включали секундомер. Фиксировалось количество пересечений квадратов, стоек, заглядываний в норы и груминг в течение 2-х минут. Общую двигательную активность определяли как сумму количества пересечений границ квадратов в периферической и в центральной частях арены за 2 минуты; поисково-исследовательскую активность определяли как сумму вертикальных перемещений и заглядываний; груминг как показатель комфортности состояния животного [178-180].

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

Методика предназначена для изучения поведения крыс в условиях стрессогенности и позволяет оценить: уровень тревожности животного (по

предпочтению темноты/света, боязни высоты, выраженности и динамике поведения «выглядывания»), симптомы неврологического дефицита, а также привыкание. Установка (НПК «Открытая наука», Россия) состоит из 4-х крестообразных рукавов, расходящихся под прямым углом от центральной площадки. ПКЛ приподнят на 80 см, два противоположных рукава открыты, оставшиеся – закрытые. В тесте ПКЛ животное помещали на центральную площадку и включали секундомер. Длительность эксперимента составляла 2 минуты. В течение эксперимента фиксировали время нахождения в открытом и закрытом рукавах, время нахождения на центральной площадке, количество стоек, актов груминга, количество выглядываний из рукавов. Уровень двигательной активности животного, характеризующий интенсивность обследования им новой среды, отражает количество переходов из отсека в отсек, а также число выглядываний из открытого рукава. Этот показатель может использоваться для оценки седативного или возбуждающего эффекта веществ. По времени нахождения в центральной площадке оценивали наличие конфликта мотиваций. Об уровне тревожности у крыс судили по времени нахождения в закрытом рукаве [181-182].

Тест условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)

Данный метод 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 (норы). Обучение животных проводилось в двухкамерной установке ерPACS-30 производства компании Columbus Instruments (Columbus Instruments, США), состоящей из затемненного и освещённого отсеков, соединённых 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.

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 [179-181].

Тест «Экстраполяционное избавление» (ТЭИ)

В тесте «Экстраполяционное избавление» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия) 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.

Препараты вводили ежедневно внутривенно в течение 3 дней после первого обучения. Животные контрольной группы получали изотонический раствор натрия хлорида в эквивалентных количествах. Время тестирования составляло не более 2-х минут [183-184].

2.5.2 Определение размера зоны некроза

Размер зоны некроза определяли трифенилтетразолиевым методом. Головной мозг крыс извлекали. Были использованы только полушария головного мозга (мозжечок отсекали), оставшиеся полушария разделяли по средней линии на равные половины. Полушария взвешивали, далее гомогенизировали и раздельно помещали в бюксы, содержащие 10 мл 1% раствора трифенилтетразолия хлорида в фосфатном буфере (рН 7,4). На 20 минут бюксы ставили на водяную баню при температуре 37 °С. Далее ткань

головного мозга осаждали (центрифугирование в режиме 5000 об/мин/10 минут). Аккуратно удаляли надосадочную жидкость. К осадку добавляли 3 мл фосфатного буфера и 3 мл охлажденного хлороформа. Встряхивали 2 мин. Хлороформный экстракт формазана получали в течение 15 мин при 4°C, встряхивая смесь каждые 5 мин по 30 сек. Центрифугировали и измеряли оптическую плотность (492 нм) против чистого хлороформа. Расчет зоны некроза выражали в процентах к общей массе полушарий [186, 187]:

$$x = 100 - \frac{\varepsilon_1 M_1 + \varepsilon_2 M_2}{\varepsilon_1 (M_1 + M_2)} 100$$

где x – размер зоны некроза в процентах к общей массе мозга;

ε_1 – экстинкция пробы с неповрежденным полушарием;

ε_2 – экстинкция пробы с поврежденным полушарием;

M_1 – масса неповрежденного полушария;

M_2 – масса поврежденного полушария.

2.5.3 Определение степени гидратации ткани головного мозга

Извлекали головной мозг. Определяли величину отека в одном полушарии в навеске массой 500 ± 2 мг. После взвешивания навески её высушивали в сушильном шкафу (при температуре 60 °C) до достижения постоянной массы. Далее производили повторное взвешивание. Массу влаги выражали в процентах от исходной массы навески [188].

2.5.4 Определение концентрации лактата, пировиноградной кислоты в сыворотке крови

Определение молочной и пировиноградной кислот в сыворотке крови осуществляли энзиматическим колориметрическим методом

спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия) с использованием стандартного набора реактивов производства компании «Абрис+» (серия:021; серия:024). Пробоподготовку осуществляли путем центрифугирования свежей цитратной крови в режиме 1000g, 10 мин до получения сыворотки. Концентрацию лактата выражали в ммоль/л, пирувата в мкмоль/л. Ход исследования определялся инструкцией к набору реактивов.

2.5.5 Определение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови

Содержания гомоцистеина в сыворотке крови проводили с применением стандартного набора реактивов «DiaSys» (Германия). Пробоподготовку осуществляли путем центрифугирования свежей цитратной крови в режиме 1000g, 10 мин до получения сыворотки. Метод основан на ферментативной циклической реакции. Общий окисленный гомоцистеин восстанавливается до свободного гомоцистеина. Свободный гомоцистеин вступает в реакцию с косубстратом S-аденозилметионином, которую катализирует гомоцистеинметилтрансферазой, с образованием метионина и S-аденозилгомоцистеина, который далее гидролизуеться SAH-гидролазой до образования аденозина и гомоцистеина. Полученный гомоцистеин снова вступает в реакцию, катализируемую гомоцистеинметилтрансферазой. Циклическая реакция приводит к значительному усилению определяемого сигнала. Далее аденозин гидролизуеться аденозиндезаминазой до инозина и аммиака, который вступает в глутаматдегидрогеназную реакцию с сопутствующим превращением НАДН в НАД⁺. Концентрация НАДН, полученная в результате реакции, измеряется при длине волны 340 нм. Сниженная концентрация НАДН пропорциональна концентрации гомоцистеина в пробе. Пробоподготовку осуществляли путем центрифугирования свежей

цитратной крови в режиме 1000g, 10 мин до получения сыворотки. Среда инкубации содержала: S-аденозилметионин 0,1 ммоль/л, НАДН 0,2 ммоль/л, ТСЕР 0,5 ммоль/л, 2-оксоглутарат 5 ммоль/л, Глутаматдегидрогеназа 10 кЕд/л, САН-гидролаза 3 кЕд/л, Аденозиндезаминаза 5 кЕд/л, Гомоцистеинметилтрансфераза 5 кЕд/л.

Оптическую плотность смеси регистрировали при 340 нм. Концентрацию гомоцистеина рассчитывали по кривой зависимости «оптическая плотность- концентрация» для стандартного образца гомоцистеина (DiaSyS). Концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови выражали в мкмоль/л [189].

2.6. Методы оценки эндотелиальной дисфункции

2.6.1 Методы регистрации скорости мозгового кровотока и оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов

Для регистрации скорости мозгового кровотока использовали ультразвуковой доплерограф датчиком с частотой 25МГц (УЗОП-010-01) и программным комплексом «Minimax Doppler» (1.7.), производства компании «Минимакс» (Санкт–Петербург, Россия). Исследование церебральной гемодинамики проводилось в теменной области головного мозга крыс в проекции средней мозговой артерии. Трепанационное отверстие высверливали в правой теменной кости животного бором, поверхность периодически охлаждали 0,9% раствором натрия хлорида. В качестве контактной среды использовали гель «Унигель». Оценку изменения вазодилатирующей функции сосудистого эндотелия проводили, анализируя скорость мозгового кровотока при введении эндотелий-специфичных анализаторов (модификация синтеза NO). В качестве модификаторов синтеза монооксида азота использовали: ацетилхолин (АЦХ) в дозе 0,1 мг/кг (Sigma-Aldrich, серия: A11040712), L-аргинин в дозе

150 мг/кг (Panreas, серия: 143464.1208), нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в дозе 15 мг/кг (Sigma-Aldrich, серия:1413116). Последующее введение анализатора осуществляли по восстановлению уровня мозгового кровотока. Все используемые тест-системы вводились внутривенно в левую бедренную вену, в процессе регистрации кровотока. По окончании необходимых манипуляций крысы выводились из эксперимента декапитированием до выхода из наркоза [190].

2.6.2 Определение агрегации тромбоцитов и скорости оседания тромбоцитов

Изучение агрегации тромбоцитов проводили на двухканальном лазерном агрегометре «АЛАТ-2» (НПФ «БИОЛА», Россия, г. Москва) по методике G. Vorn в модификации Габбасова [191-193]. Роль индуктора процесса агрегации выполняла динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) в концентрации 5 мкМ (НПО «РЕНАМ», набор «АГРЕНАМ», Серия: 1115). Метод основан на изменении светопропускания при прохождении луча через плазму, богатую тромбоцитами, во время добавления индукторов агрегации. Плазму, обогащенную тромбоцитами, получали центрифугированием в режиме 1200 об/мин/10 мин (Центрифуга 80-2S, Armed, Россия). В кювету анализатора вносили 0,3 мл плазмы, инкубировали 3 минуты при $t=37$ °С, затем добавляли индуктор – АДФ (5 мкМ). Регистрацию процесса агрегации проводили в течение пяти минут. Степень и скорость агрегации кровяных пластинок оценивали по величине максимальной амплитуды и наклону агрегатограммы.

2.7. Методы оценки антиоксидантной активности

2.7.1 Определение активности каталазы

Активность каталазы определяли в супернатанте гомогената головного мозга спектрофотометрическим методом по скорости разложения

пероксида водорода. Супернатант головного мозга получали центрифугированием гомогената в режиме - 1000g/10 мин. Количество пероксида водорода определяли в реакции с 4% раствором аммония молибдата при 410 нм. Активность каталазы регистрировали в супернатанте головного мозга спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ-56, «ЛОМО-Спектр», Россия) при длине волны 410 нм. Активность каталазы определяли как разность экстинкции опытной и холостой пробы, применяя коэффициент молярной экстинкции пероксида водорода, равный $22,2 \cdot 10^3$ мМ⁻¹см⁻¹ и выражали в нмоль/мин/мг белка. [184]. Содержание белка определяли по методу Фолина [194].

2.7.2 Определение активности супероксиддисмутазы

Активность СОД определяли в супернатанте гомогената головного мозга в реакции терминации образования формазана n-нитротетразолия хлорида (НТХ). НТХ использовали как индикатор O₂ *-, а его восстановленную форму (формазан) растворяли в ацетоне. Для генерации O₂ *- использовали систему, содержащую $2,8 \cdot 10^{-5}$ М раствора рибофлавина, $1 \cdot 10^{-2}$ М раствора ТМЭДа в 0,05 М К-фосфатном буфере (рН 7,8) при воздействии дневного света на расстоянии 20 см в течение 5 мин при комнатной температуре. Для извлечения СОД из клеточных органелл использовали 0,5% раствор дезоксихолата. Реакцию терминировали добавлением ацетона и 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Оптическую плотность измеряли на КФК-3 при 440 нм. Активность СОД выражали в ед. акт./мг белка [195].

2.7.3 Определение активности глутатионпероксидазы

Активность глутатионпероксидазы определяли в супернатанте гомогената головного мозга в сопряженной глутатионредуктазной реакции

по убыли НАДФН. Активность регистрировали в среде, содержащей $1,0 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА, 50 мМ К,Na-фосфатный буфера, pH 7,4; 1 ед. акт./мл глутатиоредуктазы; $0,2 \cdot 10^{-3}$ М НАДФН; $1,0 \cdot 10^{-3}$ М GSH; 30-60 мкг белка на 1 мл среды на КФК-3 при 340 нм. Реакцию начинали добавлением субстрата (гидропероксид кумола - $1,5 \cdot 10^{-3}$ М) и проводили при температуре 250 °С. Активность ГП выражали в ед. акт. /мг белка [196].

2.8. Методы иммуноферментного анализа

Иммуноферментные исследования проводили с применением системы микропланшетного ридера Tecan «InfiniteF50». В работе использовали видоспецифичные наборы реактивов производства «Cloudclone», а также стандартные протоколы ИФА анализа, прилагаемые к каждому набору. Образцы гомогенатов: ткани промывали в охлажденном фосфатно-солевом буфере, затем гомогенизировали в свежем лизис-буфере -1 мл лизис-буфера на 20–50 мг образца ткани, полученную суспензию обрабатывали ультразвуком до осветления и затем центрифугировали 5 минут при 10000 g. Все дальнейшие действия эксперимента воспроизводили, основываясь на методике производителя набора реактивов. В гомогенате головного мозга экспериментальных животных оценивали изменение содержания: фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкина-6 (ИЛ-6).

2.9. Методы оценки митохондриальной функции

2.9.1 Методы оценки респирометрической функции митохондрий

Крыс декапитировали под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг), производили забор головного мозга, после чего головной мозг гомогенизировали в буферном растворе с pH 7,2, состоящем из 1 ммоль/л ЭГТА, 215 ммоль/л маннита, 75 ммоль/л сахарозы, 20 ммоль/л HEPES и

0,1% раствора бычьего сывороточного альбумина. Из полученного гомогената готовили митохондриальную фракцию, путем градиентного центрифугирования в растворе перколла. Первичный гомогенат центрифугировали при ускорении 1100g на протяжении 2-х минут. Полученный супернатант разделяли на 2 аликвоты. Первую переносили в пробирки Эппендорф и наслаивали 10%-раствор перколла. Полученную смесь повторно центрифугировали при ускорении 18000g в течение 10 минут. Декантант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 1 мл изолирующего буфера и центрифугировали в течение 5 минут при 10 000 g с получением митохондриальной фракции [197].

Оценку дыхательной функции митохондрий воспроизводили методом респирометрии с использованием системы лабораторного респирометра АКПМ1-01Л (Альфа Бассенс, РФ). В эксперименте применялся протокол анализа SEAHORSE, исходя из которого респирометрическую функцию митохондрий оценивали по разнице потребления кислорода в среде на фоне введения разобщителей митохондриального дыхания. В качестве ингибиторов ферментов ЭТЦ и разобщителей использовали: олигомицин 1 мкг/мл; 4 – (трифлуорометокси)фенил гидразоно) малонитрил (FCCP – 1 мМ); ротенон – 1 мМ; натрия азид – 20 ммоль. Субстраты окисления: глюкоза – 15 ммоль; пировиноградная кислота – 10 ммоль; малат – 1 ммоль; сукцинат – 10 ммоль; аскорбат – 2 ммоль; АДФ – 1 ммоль; N,N,N',N'-тетраметил-1,4-фенилендиамин (TMPD – 0,5 ммоль). Общую оценку митохондриальной функции определяли по уровню потребления кислорода после последовательного добавления в среду олигомицина, FCCP и ротенона, при этом определяли АТФ-генерирующую способность (по разнице потребления кислорода после добавления FCCP и олигомицина); максимальный уровень дыхания (по разнице потребления кислорода после добавления FCCP и ротенона) и респираторную емкость (по разнице потребления кислорода после добавления FCCP и базальным уровнем потребления кислорода). Оценку активности процессов гликолиза

осуществляли при использовании в качестве субстрата окисления глюкозу в ходе регистрации потребления кислорода в условиях последовательного добавления в среду глюкозы, олигомицина и азида натрия. Также определяли интенсивность гликолиза (по разнице потребления кислорода после добавления глюкозы и базальным уровнем потребления кислорода), гликолитическую емкость (по разнице потребления кислорода после добавления олигомицина и глюкозы) и гликолитический резерв (по разнице потребления кислорода после добавления глюкозы и азида натрия). Дополнительно проводилась оценка активности митохондриальных комплексов I, II, IV и V электронтранспортной дыхательной цепи митохондрий. Активность комплекса I определяли по разнице потребления кислорода после внесения в среду смеси малат/пируват и ротенона. Активность комплекса II оценивали по разнице потребления кислорода после внесения в среду сукцината и олигомицина. Активность комплекса IV определяли по разнице потребления кислорода после внесения в среду смеси ротенон/ TMPD/аскорбат и азида натрия. Активность комплекса V оценивали по разнице потребления кислорода после внесения в среду ротенона и АДФ. Потребление кислорода определяли в ppm (миллионная доля) [197].

2.9.2 Методы оценки открытия митохондриальной поры

Латентное время открытия митохондриальной поры оценивали спектрофотометрическим методом. Открытие митохондриальной поры инициировали добавлением циклоспорина А. Среда инкубации содержала: 0,5 мл анализируемого супернатанта, 0,5 мл 1мкМ раствора циклоспорина А. Полученную смесь доводили до 2 мл буферным раствором HEPES с pH 7,4. Открытие митохондриальной поры определяли спектрофотометрически при $\lambda = 540$ нм при 25 °С и постоянном перемешивании в течение 25

минут. Латентное время открытия митохондриальной поры оценивали в секундах, регистрируя снижение экстинкции проб с 0,4 до 0,2 [198].

2.9.3 Методы оценки митохондриального мембранного потенциала

Митохондриальный трансмембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) оценивали стандартной методикой Вальдмайера и др. с использованием спектрофлуориметра Shimadzu RF -1501 (Shimadzu, Япония) [199]. Среда инкубации содержала: 0,5 мл анализируемого супернатанта, 0,5 мл 9мкМ раствора сафранина О. Полученную смесь доводили до 2 мл раствором HEPES с pH 7,4. Оптическую плотность смеси регистрировали при $\lambda=515$ нм и $\lambda=525$ нм. Трансмембранный электрохимический градиент, $\Delta\Psi$ определяли по разнице светопоглощения: $\Delta\Psi = A_{515} - A_{525} * 1000$, усл. ед. [199].

2.9.4 Методы оценки концентрации кальция

Содержание кальция в образцах определяли спектрофотометрическим методом с использованием в качестве репортера флуоресцеин. Среда инкубации содержала по 100 μ л анализируемого образца и флуоресцеина. Интенсивность флуоресцентного сигнала определяли при длинах волн возбуждения/эмиссии 360 нм/480 нм. Содержание кальция определяли в ммоль/мг белка [200, 201].

2.9.5 Методы статистической обработки результатов эксперимента

Статистический анализ результатов, полученных в ходе проведенной экспериментальной работы, осуществляли с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной

системы Windows) и Microsoft Excel 2010. Вычисляли среднее значение и стандартную ошибку среднего значения ($M \pm m$). Для проверки нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро-Уилка. В случае подчинения данных закону нормального распределения для сравнения групп средних применяли параметрические методы ANOVA с пост-обработкой Ньюмана-Кейлса, непараметрические методы – Краскела-Уоллиса [202, 203].

ГЛАВА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ВЛИЯНИЯ ФЛАВОНОИДОВ И ПРОИЗВОДНЫХ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ВЕЛИЧИНУ ЗОНЫ НЕКРОЗА, ОТЕК ГОЛОВНОГО МОЗГА, КОНЦЕНТРАЦИЮ ПИРОВИНОГРАДНОЙ, МОЛОЧНОЙ КИСЛОТ И ГОМОЦИСТЕИНА, ОЦЕНКА КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ КРЫС НА ФОНЕ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В рамках фармакологического скрининга флавоноидов и производных коричной кислоты в условиях ишемии головного мозга изучали церебропротективную активность куркумина, теафлавина, хризина, хризантемина, глицитеина, диосмина, гесперидина, гиперозида, мальвидина, а также галловой, коричной, сорбиновой, кофейной кислот. Изучалось влияние исследуемых соединений на размер зоны некроза, отека головного мозга, которые формируются при ишемическом поражении. Так как цереброваскулярная патология сопровождается метаболическими и энергообменными нарушениями в головном мозге, мы оценивали концентрации молочной, пировиноградной кислот и гомоцистеина в сыворотке крови [204].

При ишемическом повреждении головного мозга наблюдаются функциональные нарушения, исходя из этого, был проведен ряд тестов, позволяющих определить степень неврологического дефицита, выражающегося в нарушениях когнитивных и мнестических функций [205, 206].

Животные перед экспериментом были рандомизированы по поведенческой активности в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Открытое поле», «Тест экстраполяционного избегания», «Условная реакция пассивного избегания».

3.1. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на двигательную, ориентировочно исследовательскую активность и психо-эмоциональный статус в тесте «Открытое поле» в условиях фокальной церебральной ишемии

Предварительно, до осуществления эксперимента, животные были рандомизированы по поведенческой активности в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Открытое поле», «Условная реакция пассивного избегания» и «Тест экстраполяционного избегания».

У животных с фокальной ишемией головного мозга показатели двигательной и ориентировочно исследовательской активности были ниже относительно показателей группы ЛО крыс. Так, число пройденных квадратов группы крыс НК было в 2,27 раза ($p < 0,05$) ниже, число стоек в 3 раза ($p < 0,05$) и число заглядываний ниже в 5,7 раза ($p < 0,05$). Психоэмоциональный статус животных оценивали по уменьшению времени нахождения в центральном квадрате установки и по увеличению числа актов груминга. У группы крыс НК время, проведенное в центре было выше в 13 раз ($p < 0,05$), а количество актов груминга возросло в 3,6 раза ($p < 0,05$) (Таблица 3).

Мексидол привел к увеличению количества пройденных квадратов в 4,46 раза ($p < 0,05$), стоек в 4,5 раза ($p < 0,05$) и заглядываний на 2,6 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. При этом время в центральном квадрате и груминг были уменьшены в 1,97 раза ($p < 0,05$) и в 2,2 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных НК (Таблица 3).

Относительно группы крыс НК, у животных, получавших ацетилцистеин, число пройденных квадратов было выше в 4,62 раза ($p < 0,05$), количество стоек в 4,96 раза ($p < 0,05$), а заглядываний в 3,2 раза ($p < 0,05$) выше, соответственно. Время в центральном квадрате и число актов груминга снизились в 4,7 раза ($p < 0,05$) и 4,2 раза ($p < 0,05$).

В сравнении с группой крыс НК, у группы, получавшей диосмин, число пройденных квадратов, стоек и заглядываний увеличилось в 4,5 раза ($p < 0,05$), 5,2 раза ($p < 0,05$) и в 3,3 раза ($p < 0,05$) соответственно. Время в центральном квадрате и количество актов груминга снизились в 6,24 раза ($p < 0,05$) и 7,6 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Количество пройденных квадратов, стоек и заглядываний у группы крыс, которой вводили гесперидин, были увеличены в 3,7 раза ($p < 0,05$), 3,8 раза ($p < 0,05$) и в 3,8 раза ($p < 0,05$) соответственно, а время в центральном квадрате снизилось в 4,6 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК (Таблица 3).

Хризантемина способствовал увеличению числа пройденных квадратов, стоек и заглядываний в 3,3 раза ($p < 0,05$), в 2,5 раза ($p < 0,05$) и 2,1 раза ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с группой крыс НК. При этом время в центральном квадрате снизилось в 8 раз ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК.

У крыс, получавших в качестве фармакологической поддержки хризин, количество пройденных квадратов, стоек и заглядываний увеличились в 4,4 раза ($p < 0,05$), в 2,8 раза ($p < 0,05$) и в 2,1 раза ($p < 0,05$) соответственно, а время в центральном квадрате и число актов груминга были снижены в 6,6 раза ($p < 0,05$) и на 1,9 раза ($p < 0,05$) относительно группы НК животных.

При введении мальвидина крысам наблюдалось увеличение числа пройденных квадратов, стоек и заглядываний в 6 раз ($p < 0,05$), в 5,5 раза ($p < 0,05$) и в 3,7 раза ($p < 0,05$), при этом время в центральном квадрате и число актов груминга уменьшились в 7 раз ($p < 0,05$) и в 3,2 раза ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с группой крыс НК. Стоит отметить, что относительно группы крыс, которой вводили мексидол, время в центральном квадрате и груминг были снижены в 1,97 раза ($p < 0,05$) и в 2,2 раза ($p < 0,05$), а число квадратов, стоек и заглядываний были увеличены в 1,35 раза ($p < 0,05$), 1,2 раза ($p < 0,05$) и 1,48 раза ($p < 0,05$). Относительно

группы крыс, получавшей ацетилцистеин, число квадратов, стоек и заглядываний были увеличены в 1,3 раза ($p<0,05$), в 1,1 раза ($p<0,05$) и 1,15 раза ($p<0,05$) соответственно, а время в центральном квадрате уменьшилось в 1,5 раза ($p<0,05$) (Таблица 3, 4).

Таблица 3 – Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на двигательную, ориентировочно-исследовательскую активности в тесте «Открытое поле» в условиях фокальной церебральной ишемии

Исследуемые группы, (n=6)	Показатели		
	Пересечения квадратов, ед.	Стойки, ед.	Заглядывания, ед.
ЛО	12,9±1,32	4,1±0,61	5,71±0,463
НК	5,67±0,8#	1,33±0,11#	1±0,33#
Мексидол	25,33±2,3* (4,66 раз)	6±0,45* (4,5 раз)	2,5±0,4* (2,6 раз)
Ацетилцистеин	26,2±1,35* (4,62 раз)	6,6±2,56* (4,96 раз)	3,2±0,47* (3,2 раз)
Диосмин	25,4±7,86* (4,48 раз)	6,8±1,87* (5,2 раз)	3,2±0,4* (3,3 раз)
Гесперидин	21,337,25* (3,7 раз)	5,17±1,73* (3,8 раз)	3,83±1,07* (3,83 раз)
Хризантемин	18,6±5,9* (3,3 раз)	3,4±1,01* (2,5 раз)	2,1±0,8* (2,1 раз)
Хризин	25±8,41* (4,4 раз)	3,83±1,34* (2,88 раз)	2,4±0,65* (2,1 раз)
Мальвидин	34,17±3,5* (6,0 раз)	7,33±0,44* (5,5 раз)	3,7±0,4* (3,7 раз)
Куркумин	25,83±8,03* (4,5 раз)	5,67±1,3* (76,5 раз)	1,2±0,47
Теафлавин	22,6±7,9* (3,9 раз)	4,2±1,43* (3,16 раз)	1,4±0,49
Сорбиновая кислота	18,6±6* (3,28 раз)	4,6±1,26* (3,45 раз)	1,1±0,89
Кофейная кислота	22,33±7,61* (3,94 раз)	4,33±1,4* (3,25 раз)	1,33±0,37

Р и м е ч а н	Галловая кислота	26,6±8,26* (4,69 раз)	6,4±2,88* (4,8 раз)	4,4±0,49* (1,33 раз)
	Коричная кислота	23,17±10,2 (4 раза)	6±0,87* (4,5 раз)	3,5±0,5* (3,5 раз)
	Гиперозид	21,4±5,21* (3,77 раз)	4,2±0,4* (3,16 раз)	1,2±0,4
	Глицитеин	26±8,21* (4,58 раз)	4,5±0,5* (3,38 раз)	1,7±0,43

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

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

разы - увеличение числа пройденных квадратов, стоек, заглядываний и уменьшение времени в центральном квадрате и актов груминга животными в сравнении с группой НК.

Таблица 4 – Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на уровень тревожности в тесте «Открытое поле» в условиях фокальной церебральной ишемии

Исследуемые группы, (n=6)	Показатели	
	Время в центральном квадрате, сек.	Груминг, ед.
ЛО	2,6±0,523	3,8±1,03
НК	33,83±3,48#	13,67±4,4#
Мексидол	17,17±5,7* (1,97 раз)	6,2±0,7* (2,2 раз)
Ацетилцистен	7,2±0,2* (4,69 раз)	3,2±0,75* (4,27 раз)
Диосмин	5,4±1,08* (6,24 раз)	1,8±0,94* (7,6 раз)
Гесперидин	7,33±1,15* (4,62 раз)	12±1,83
Хризантемин	4,2±0,31* (8,0 раз)	12,6±1,85
Хризин	5,1±1,76* (6,63 раз)	6,9±1,002 (1,98 раз)

Мальвидин	4,83±1,1* (7,0 раз)	4,22±0,5* (3,24 раз)
Куркумин	2,3±0,61* (14,7 раз)	8,33±1,6 (1,6 раз)
Теафлавин	3,6±1,24* (9,4 раз)	9,8±2,14 (1,4 раз)
Сорбиновая кислота	17,4±4,22* (1,9 раз)	7,4±1,02 (1,85 раз)
Кофейная кислота	25,17±11,51	7,67±1,8 (1,78 раз)
Галловая кислота	5,4±1,92* (6,26 раз)	6,2±1,94* (6,2 раз)
Коричная кислота	7,33±1,95* (4,6 раз)	7,5±1,8 (1,82 раз)
Гиперозид	6,4±1,45* (5,3 раз)	6,8±1,17 (2 раза)
Глицитеин	3,75±1,77* (9,0 раз)	6,75±0,83 (2 раза)

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

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

разы – увеличение числа пройденных квадратов, стоек, заглядываний и уменьшение времени в центральном квадрате и актов груминга животными в сравнении с группой НК.

Мальвидин привел к увеличению количества пройденных квадратов в 6 раз ($p < 0,05$) и числа стоек в 5,5 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК (Таблица 4).

Число пройденных квадратов, стоек и заглядываний у животных, получавших теафлавин, было выше, чем у группы крыс НК в 3,9 раза ($p < 0,05$), в 3,2 раза ($p < 0,05$) и в 1,4 раза ($p < 0,05$), при этом время в центральном квадрате и количество актов груминга были уменьшены в 9,4 раза ($p < 0,05$) и в 1,4 раза ($p < 0,05$) соответственно.

У крыс, которым вводили сорбиновую кислоту в сравнении с группой крыс НК, количество пройденных квадратов, стоек и заглядываний было увеличено в 3,3 раза ($p < 0,05$), в 3,5 раза ($p < 0,05$) и в 1,1 раза ($p < 0,05$), а

время в центральном квадрате и число актов груминга были снижены в 1,9 раза ($p < 0,05$) и 1,9 раза ($p < 0,05$) соответственно.

При введении животным кофейной кислоты число пройденных квадратов было увеличено в 3,94 раза ($p < 0,05$), количество стоек в 3,25 раза ($p < 0,05$), заглядываний – в 1,3 раза ($p < 0,05$), время в центральном квадрате и груминг были снижены в 1,34 раза ($p < 0,05$) и в 1,8 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК.

В сравнении с группой крыс НК, у животных, которой вводили галловую кислоту, количество пройденных квадратов, стоек и заглядываний увеличилось в 4,7 раза ($p < 0,05$), в 4,8 раза ($p < 0,05$) и в 1,33 раза ($p < 0,05$), а время в центральном квадрате и число актов груминга были снижены в 6,3 раза ($p < 0,05$) и в 6,2 раза ($p < 0,05$) количество актов груминга.

Введение крысам коричной кислоты способствовало увеличению пройденных квадратов в 4 раза ($p < 0,05$), стоек в 4,5 раза ($p < 0,05$) и заглядываний в 3,5 раза ($p < 0,05$), а также снижению времени в центральном квадрате и число актов груминга в 4,6 раза ($p < 0,05$) и в 1,8 раза ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с группой крыс НК.

Число пройденных квадратов, стоек и заглядываний у животных, которые получали гиперозид, было увеличено в 3,7 раза ($p < 0,05$), в 3,2 раза ($p < 0,05$) и в 1,2 раза ($p < 0,05$), а время пройденных квадратов и груминг снизились в 5,3 раза ($p < 0,05$) и в 2 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно группы крыс НК.

У группы крыс, получавшей глицитеин, наблюдалось увеличение количества пройденных квадратов, стоек и заглядываний в 4,6 раза ($p < 0,05$), в 3,4 раза ($p < 0,05$) и в 1,7 раза ($p < 0,05$), а также снижение времени нахождения в центральном квадрате и числа число актов груминга в 9 раз ($p < 0,05$) и в 2 раза ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с группой крыс НК (Таблица 4).

В соответствии с данными, полученными в тесте «Открытое поле» был сформирован ряд активности соединений: АЦЦ > Мальвидин >

Мексидол > Галловая кислота > Хризин > Диосмин > Глицитеин > Коричная кислота > Куркумин > Гиперозид > Сорбиновая кислота > Гесперидин > Кофейная кислота > Хризантемин > Теафлавин

3.2. Влияние введения исследуемых соединений и препаратов сравнения на уровень тревожности и двигательной активности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях ишемии головного мозга крыс

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» оценивали уровень тревожности крыс, а также уровень горизонтальной и вертикальной двигательной активности. По таким показателям, как время в центральном квадрате, время в открытом рукаве, время в закрытом рукаве и число актов груминга судили об уровне тревожности животных. По показателям количества переходов из одного рукава в другой рукав, числу свешиваний в открытом рукаве и грумингу оценивали двигательную активность крыс.

После моделирования ишемии головного мозга, у животных наблюдалось повышение тревожности, что выражалось в снижении времени нахождения крыс в открытом рукаве. Так, у группы крыс НК относительно группы ложноперированных животных время в открытом рукаве уменьшилось в 51,08% ($p < 0,05$), время в закрытом рукаве и число актов груминга увеличились на 25,95% ($p < 0,05$) и на 484,% ($p < 0,05$), также наблюдалось снижение числа переходов на 65% ($p < 0,05$), свешиваний на 58% ($p < 0,05$) и стоек на 78,94% ($p < 0,05$), соответственно (Таблица 5).

У животных, получавших мексидол время в центральном квадрате увеличилось на 150,4% ($p < 0,05$), в открытом рукаве на 197,5% ($p < 0,05$), соответственно. Время в закрытом рукаве было ниже на 39,4% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК. Число актов груминга было снижено на 42,2% ($p < 0,05$), а количество переходов было увеличено на 385% ($p < 0,05$),

свешиваний на 223,8% ($p < 0,05$) и стоек на 226,2% ($p < 0,05$) относительно группы НК.

Ацетилцистеин способствовал уменьшению времени в центральном квадрате на 16,7% ($p < 0,05$), к уменьшению груминга на 104,98% ($p < 0,05$) и повышению числа переходов, свешиваний и стоек на 59% ($p < 0,05$), 94,44% ($p < 0,05$) и на 73,75% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. При сравнении группы, получавшей ацетилцистеин и группы НК по показателям «время в открытом рукаве» и «время в закрытом рукаве» статистически значимых отличий не наблюдалось.

У крыс, которым вводили диосмин, время в центральном квадрате и количество актов груминга были снижены на 19,23% ($p < 0,05$) и 44% ($p < 0,05$), тогда как количество переходов, свешиваний и стоек было выше на 59% ($p < 0,05$), 94,4% ($p < 0,05$) и 125 % ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. При сравнении группы, получавшей диосмин с группой НК по показателям «время в открытом рукаве» и «время в закрытом рукаве» статистически значимых отличий не наблюдалось.

Относительно группы крыс НК у животных, получавших гесперидин, время в центральном квадрате снизилось на 29,4% ($p < 0,05$), время в открытом рукаве увеличилось на 98% ($p < 0,05$). Число актов груминга уменьшилось на 56,3% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. При введении гесперицина крысам статистически значимого увеличения количества переходов, свешиваний и стоек не наблюдалось.

Время в центральном квадрате у крыс, которым вводили хризантемин, в сравнении с группой крыс НК уменьшилось на 62,2% ($p < 0,05$), время в открытом рукаве увеличилось на 121,5% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК крыс. Количество груминга было ниже на 45,9% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК. При этом введение хризантемина животным не способствовало достоверно значимому увеличению числа переходов, свешиваний и стоек относительно группы особей, не получавших фармакологической поддержки (группа НК).

У животных, получавших хризин, относительно группы крыс НК, количество актов груминга было снижено на 100% ($p < 0,05$), тогда как количество свешиваний увеличилось на 279,4% ($p < 0,05$). При этом хризин не приводил к статистически значимому снижению времени в закрытом рукаве, и повышению числа переходов и стоек в сравнении с группой НК (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на уровень тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях ишемии головного мозга крыс

Исследуемые группы, (n=6)	Показатели			
	Вр. в центр. кв., сек.	Вр. в откр. рук., сек.	Вр. в закр. рук., сек.	Груминг, ед.
ЛО	9,1±0,4	32,3±1,6	78,6±1,2	3,8±0,6
НК	5,2±0,15#	15,8±1,25#	99±9#	22,2±2,56#
Мексидол	13±2,7* (150%)	47±2* (197,5%)	60±7,75* (39,4%)	12,83±3,6* (42,2%)
АЦЦ	4,33±0,35* (16,7%)	12,83±4,5 (18,8%)	102,83±11,9	10,83±1,07* (51,2%)
Диосмин	4,2±1,34 (19,23%)	16,83±4,5	99,1±11,9	12,4±1,07* (44,0%)
Гесперидин	3,67±0,25* (29,4%)	31,33±6* (98,0%)	84,83±13,5 (14,3%)	9,7±0,76* (56,3%)
Хризантемин	1,6±0,73* (69,2%)	35±7,38* (121,5%)	83,4±9,6 (15,75%)	12±2 (45%)
Хризин	6,67±8,83 (28,26%)	21,67±7,2 (37,15%)	91,67±8,12 (7,4%)	0±0* (100%)
Мальвидин	2,17±0,34* (58,3%)	57,17±44* (261,8%)	60,67±10,9* (38,7%)	6,9±0,76* (68,9%)
Куркумин	3,5±0,72* (11,2%)	39±9,73* (121,5%)	61,17±10,7* (15,7%)	11,83±1,06* (37,9%)

	(32,62%)	(146,8%)	(37,67%)	(46,7%)
Теафлавин	2±0,52* (61,6%)	32,17±11,3 (103,6%)	87±10,47 (12,12%)	21,33±1,8 (4,05%)
Сорбиновая кислота	5,6±1,31 (34,17%)	21,2±9,3	94±10,2	20,8±1,16
Кофейная кислота	5,67±0,9	1,5±0,35*	112,83±6,5	22,7±8,4
Галловая кислота	2,2±0,72* (57,69%)	39,8±2,03* (20,6%)	78,6±13,28 (151,89%)	17,1±0,9 (22,9%)
Коричная кислота	0,83±0,07* (84,0%)	52,17±14,7* (32,15%)	67,17±13,9 (32,1%)	11±3,91* (50,45%)
Гиперозид	6,6±0,8 (26,92%)	20,2±8,04 (132,6%)	93,2±7,4 (5,8%)	11±2,63* (50,45%)
Глицитеин	2,5±3,7 (51,9%)	36,75±17,1 (132,50%)	3±16,73 (16,16%)	21,25±7,8 (4,3%)

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

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

% - снижение времени в центральном квадрате, в закрытом рукаве, актов груминга, а также повышение времени в открытом рукаве, числа переходов, свешиваний и стоек в сравнении с группой НК.

Мальвидин привел к уменьшению времени в центральном квадрате на 58,3% ($p < 0,05$) и увеличению времени в открытом рукаве на 261,8% ($p < 0,05$), уменьшению времени в закрытом рукаве на 38,7% ($p < 0,05$) и снижению числа актов груминга на 68,9% ($p < 0,05$) относительно группы животных НК. При этом наблюдалось увеличение числа переходов животными, свешиваний и стоек на 369,5% ($p < 0,05$), на 327,7% ($p < 0,05$) и на 296,6% ($p < 0,05$). Относительно группы крыс, которой вводили мексидол, у животных, получавших мальвидин, время в центральном квадрате было снижено на 83%, время в открытом рукаве увеличено на 21,6% ($p < 0,05$), число актов груминга уменьшилось на 46% ($p < 0,05$). При сравнении числа

переходов и времени в закрытом рукаве у данных групп статистически значимых отличий не наблюдалось. В сравнении с группой особей, получавших ацетилцистеин, у крыс, получавших мальвидин, время в центральном квадрате, закрытом рукаве, а также груминг снизились на 49,8% ($p < 0,05$), 40,9% ($p < 0,05$) и 36,3% ($p < 0,05$), тогда как время в открытом рукаве было увеличено на 345,6% раз ($p < 0,05$). При этом количество переходов повысилось на 195% ($p < 0,05$), стоек на 125,4% ($p < 0,05$) (Таблица 6).

В сравнении с животными группы НК, у особей, которым вводили куркумин, время в центральном квадрате снизилось на 32,62% ($p < 0,05$), время в открытом рукаве увеличилось на 146,8% ($p < 0,05$), в закрытой снизилось на 37,67% ($p < 0,05$), груминг был снижен на 46,7% ($p < 0,05$). При этом не отмечено достоверное повышение числа переходов, свешиваний и стоек относительно группы НК.

По сравнению с группой НК, у крыс, получавшей теафлавин, время в центральном квадрате снизилось на 61,5% ($p < 0,05$). Не наблюдалось статистически значимых изменений времени в открытом/закрытом рукаве, числа стоек, груминга, переходов и свешиваний при введении теафлавина с группой крыс НК.

При введении животным сорбиновой и кофейной кислот не наблюдалось статистически значимых изменений экспериментальных показателей теста с группой крыс НК.

Таблица 6 – Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на двигательную активность животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях ишемии головного мозга крыс

Исследуемые группы, (n=6)	Показатели	
	Свешивания, ед.	Стойки, ед.
ЛО	4,3±0,67	11,4±1,38
НК	1,8±0,98#	2,4±0,8#
Мексидол	5,83±1,6* (223,8%)	7,83±1,86* (226,2%)
Ацетилцистеин	3,5±1,71*	4,17±1,95*

	(94,4%)	(37,75%)
Диосмин	6,5±1,7* (94,4%)	5,4±1,95 (125,0%)
Гесперидин	7,67±8,08 (326,1%)	6,17±1,57 (157,0%)
Хризантемин	6,2±5,08 (3,4 раза)	9,4±0,8* (291,6%)
Хризин	6,83±0,96* (244,2%)	5,5±1,6 (129,2%)
Мальвидин	7,7±1,39* (327,7%)	9,4±0,91* (296,6%)
Куркумин	4±11,91 (122,2 %)	4,17±1,79 (73,75%)
Теафлавин	2,67±0,94 (48,3%)	1,83±0,26
Сорбиновая кислота	3,4±1,85 (88,8%)	2,8±1,6 (16,6%)
Кофейная кислота	0,67±0,49	5,17±1,21 (115,4%)
Галловая кислота	4,8±0,64* (166,6 %)	4±0,74 (66,6%)
Коричная кислота	4,33±0,54* (140,5 %)	4,5±1,22 (87,5%)
Гиперозид	4,2±1,61 (133,3%)	4±0,37 (66,6%)
Глицитеин	3,25±0,43 (80,5%)	3,8±1,86 (58,3%)

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

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

% - снижение времени в центральном квадрате, в закрытом рукаве, актов груминга, а также повышение времени в открытом рукаве, числа переходов, свешиваний и стоек в сравнении с группой НК.

Галловая кислота способствовала уменьшению времени в центральном квадрате на 57,69% ($p < 0,05$) и увеличению времени в открытом рукаве на 151,89% ($p < 0,05$), а также повышению числа свешиваний на 166,6% ($p < 0,05$), соответственно, относительно группы животных НК. При этом галловая кислота не оказала статистически

значимого влияния на количество актов груминга, число переходов и стоек в сравнении с группой НК.

В сравнении с группой НК время в центральном квадрате у крыс, получавших коричневую кислоту, было снижено на 84% ($p < 0,05$), время в открытом рукаве было увеличено на 32,1% ($p < 0,05$), число актов груминга снизилось на 87,5% ($p < 0,05$), при этом также было увеличено количество свешиваний на 140,5% ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с группой крыс НК.

При введении крысам гиперозида было отмечено достоверное снижение количества актов груминга на 66,6% ($p < 0,05$). При сравнении других показателей статистически значимых отличий не отмечено.

Введение глицистеина крысам не оказало статистически значимого изменения исследуемых показателей в сравнении с группой, не получавшей фармакологической поддержки.

3.3. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на латентный период подныривания крыс в тесте экстраполяционного избавления в условиях ишемии головного мозга

Воспроизведение ишемического повреждения головного мозга крысам привело к увеличению времени подныривания животных в ТЭИ в 3,45 раза ($p < 0,05$) относительно здоровых крыс (Рисунок 8).

На фоне введения крысам референтных препаратов период выполнения экстраполяционной задачи был сокращен. Так, введение мексидола крысам способствовало уменьшению времени подныривания на 63,5% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК, а введение ацетилцистеина – на 32% ($p < 0,05$).

Время подныривания животных также уменьшалось при введении крысам диосмина, гесперидина, хризантемина и хризина на 27,4% ($p < 0,05$),

на 44,3% ($p < 0,05$), на 37,6% ($p < 0,05$) и на 42,4% ($p < 0,05$) соответственно относительно группы крыс, не получавшей фармакотерапии (группа НК).

Введение крысам мальвидина, куркумина, теафлавина и сорбиновой кислоты укорачивало латентное время решения задачи на 60,1% ($p < 0,05$), 20,4% ($p < 0,05$), 41,9% ($p < 0,05$) и на 51,7% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК.

Относительно группы крыс НК, кофейная, галловая и коричная кислота приводили к уменьшению времени подныривания крыс на 40,5% ($p < 0,05$), 56,2% ($p < 0,05$) и 54,2% ($p < 0,05$) соответственно.

У крыс, получавших гиперозид и глицитеин, латентный период подныривания был ниже, чем у животных группы НК на 31,5% ($p < 0,05$) и на 23,5% ($p < 0,05$) соответственно (Рисунок 8).

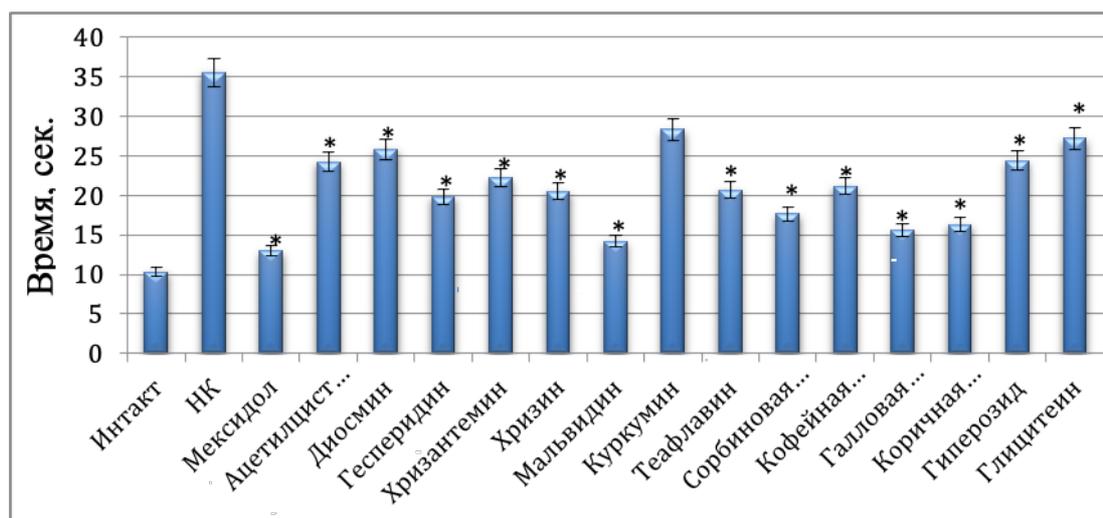


Рисунок 8 – Изменение латентного периода подныривания под влиянием исследуемых соединений и препаратов сравнения в тесте экстраполяционного избавления в условиях фокальной церебральной ишемии

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

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

3.4. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на латентный период захода крыс в темный отсек в тесте УРПИ в условиях ишемии головного мозга

На фоне ишемии головного мозга время захода крыс в темный отсек увеличилось в 28,6 раза ($p < 0,05$) относительно группы животных ЛО. Мексидол привел к увеличению латентного времени захода особей в отсек в 11,8 раза ($p < 0,05$), тогда как введение ацетилцистеина в 14,7 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК (Рисунок 9).

У крыс, которые получали в качестве фармакологической поддержки диосмин и гесперидин данный показатель был увеличен в 9,5 раза ($p < 0,05$) и в 4,52 раза ($p < 0,05$) относительно группы животных НК.

Время захода в темный отсек у крыс, получавшим хризантемин и хризин повысилось в 3,8 раза ($p < 0,05$) и в 9,8 раза ($p < 0,05$) относительно группы НК крыс.

Мальвидин и куркумин также увеличивали латентный период захода особей в отсек в 13,2 раза ($p < 0,05$) и в 5,9 раза ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с группой крыс, не получавших фармакологической поддержки.

У животных, которым вводили теафлавин и сорбиновую кислоту латентное время посещения темной камеры крысой было увеличено в 3 раза ($p < 0,05$) и в 5 раз ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК.

Относительно группы крыс НК также наблюдалось увеличение времени захода особей в отсек у животных, получавших кофейную (в 4,3 раза ($p < 0,05$)) и галловую кислоту (в 9,9 раза ($p < 0,05$)).

На фоне введения животным коричной кислоты, гиперозида и глицитеина латентный период посещения крысами темной норы был повышен в 7,6 раза ($p < 0,05$), в 5,4 раза ($p < 0,05$) и в 8 раз ($p < 0,05$) соответственно относительно группы крыс НК (Рисунок 9).

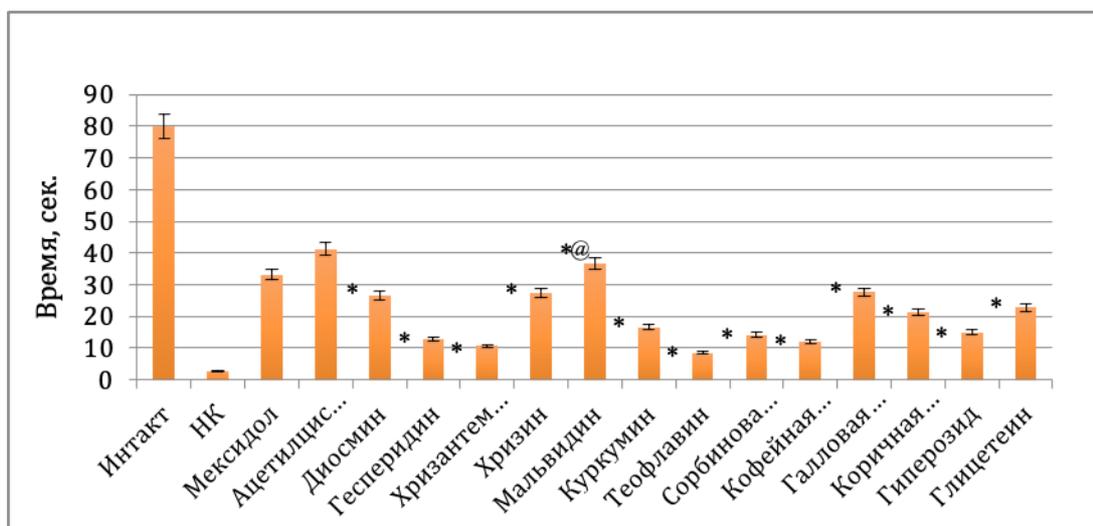


Рисунок 9 – Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на латентный период захода крыс в тёмный отсек норы в тесте УРПИ в условиях ишемии головного мозга

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

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

@ - статистически значимо относительно группы животных, получавшей мексидол (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).

Данные, полученные в ходе проведенного фармакологического скрининга, позволяют выделить мальвидин как наиболее эффективное среди исследуемых соединений. Соответственно, целесообразным является сравнительный анализ мальвидина с другими изучаемыми веществами.

Отмечено, что мальвидин по влиянию на объём зоны некроза головного мозга превзошел куркумин на 55,8% ($p < 0,05$), галловую кислоту на 48% ($p < 0,05$), коричную кислоту на 36,1% ($p < 0,05$), теафлавин на 35,9% ($p < 0,05$), хризантемин на 35,5% ($p < 0,05$), глицетеин на 37,3% ($p < 0,05$), диосмин на 30,5% ($p < 0,05$), гиперозид на 30,1% ($p < 0,05$), сорбиновую кислоту на 29,4% ($p < 0,05$), гесперидин на 22,5% ($p < 0,05$). В сравнении с группой, получавшей кофейную кислоту и хризин, статистически значимых отличий не наблюдалось.

Мальвидин приводил к более выраженному снижению концентрации молочной кислоты в сравнении с куркумином на 20,9% ($p < 0,05$),

гесперидином - на 16,9% ($p < 0,05$), хризином- на 22,4% ($p < 0,05$), хризантемином - на 18,86% ($p < 0,05$). При сравнении мальвидина с другими экспериментальными соединениями статистически значимых отличий не выявлено.

При применении мальвидина наблюдалось более выраженное снижение концентрации пирувата в сравнении с глицитеином на 35,6% ($p < 0,05$), галловой кислотой на 29,2% ($p < 0,05$), куркумином на 28,8% ($p < 0,05$). Сравнение мальвидина с другими исследуемыми веществами не показало статистически значимых отличий.

Мальвидин способствовал более выраженному снижению концентрации гомоцистеина относительно глицитеина на 24,9% ($p < 0,05$), хризина на 22,8% ($p < 0,05$), хризантемина на 14,1% ($p < 0,05$). Статистически значимых отличий при сравнении мальвидина и остальных исследуемых соединений не обнаружено.

Сравнительный анализ, проведенный по данным, полученным в тесте «Открытое поле» показал, что мальвидин по количеству пересеченных квадратов превзошел сорбиновую кислоту на 83,7% ($p < 0,05$), коричную кислоту на 47,5% ($p < 0,05$), гесперидин на 60,1% ($p < 0,05$), хризантемин на 83,7% ($p < 0,05$), кофейную кислоту на 53,0% ($p < 0,05$), гиперозид на 59,6% ($p < 0,05$), теафлавин на 51,2% ($p < 0,05$), диосмин на 34,5% ($p < 0,05$), хризин на 36,7% ($p < 0,05$), куркумин на 32,4% ($p < 0,05$), галловую кислоту на 28,5% ($p < 0,05$), глицитеин на 31,4% ($p < 0,05$). Введение крысам мальвидина способствовало более выраженному увеличению числа стоек в сравнении с гесперидином на 41,8% ($p < 0,05$), хризантемином на 115, 6% ($p < 0,05$), хризином на 91,4% ($p < 0,05$), куркумином на 29,3% ($p < 0,05$), теафлавином на 74,5% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 59,3% ($p < 0,05$), кофейной кислотой на 69,2% ($p < 0,05$), коричной кислотой на 22,2% ($p < 0,05$), гиперозидом на 74,5% ($p < 0,05$) и глицитеином на 62,8% ($p < 0,05$). Время в центральном квадрате у мальвидина было статистически значимо ниже по отношению к другим экспериментальным соединениям: в сравнении с глицитеином на

28,8% ($p < 0,05$), гиперозидом на 24,5% ($p < 0,05$), гесперидином на 34,1% ($p < 0,05$), коричной кислотой на 34,1% ($p < 0,05$), кофейной кислотой на 80,8% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 72,2% ($p < 0,05$). В сравнении с другими экспериментальными соединениями статистически значимых отличий не выявлено. Количество актов груминга у группы, которой вводили мальвидин, было статистически значимо ниже в сравнении с диосмином на 134,0% ($p < 0,05$), гесперидином на 64,8% ($p < 0,05$), хризантемином на 66,5% ($p < 0,05$), хризином на 38,8% ($p < 0,05$), куркумином на 49,3% ($p < 0,05$), теафлавином на 56,9% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 42,9% ($p < 0,05$), кофейной кислотой на 44,9% ($p < 0,05$), галловой кислотой на 31,9% ($p < 0,05$), коричной кислотой на 43,7% ($p < 0,05$), гиперозидом на 37,9% ($p < 0,05$), глицистеином на 37,5% ($p < 0,05$).

Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» показали, что животные, получавшие мальвидин, меньше времени находились в центральном квадрате, чем группы крыс, получавших остальные соединения. Мальвидин статистически значимо снижал время в центральном квадрате в сравнении с диосмином на 48,3% ($p < 0,05$), гесперидином на 40,9% ($p < 0,05$), хризином на 67,4% ($p < 0,05$), куркумином на 38,0% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 61,3%, кофейной кислотой на 61,7% ($p < 0,05$), гиперозидом на 67,1% ($p < 0,05$). При сравнении мальвидина с группами крыс, получавших глицистеин, коричную кислоту, галловую кислоту, теафлавин, хризантемин статистически значимых отличий не выявлено. Также мальвидин увеличивал время нахождения крыс в открытом рукаве в сравнении с диосмином на 239% ($p < 0,05$), гесперидином на 82,5% ($p < 0,05$), хризином на 163,4% ($p < 0,05$), куркумином на 46,4% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 169,3% ($p < 0,05$), гиперозидом на 182,6% ($p < 0,05$), глицистеином на 55,3% ($p < 0,05$), хризантемином на 63,3%, теафлавином на 77,5% ($p < 0,05$), галловой кислотой на 43,6% ($p < 0,05$). Соответственно, при введении мальвидина также наблюдалось снижение продолжительности нахождения животных в закрытом рукаве в сравнении с

диосмином на 32,8% ($p < 0,05$), гесперидином на 28,5% ($p < 0,05$), хризинном на 33,8% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 35,45% ($p < 0,05$), кофейной кислотой на 46,2% ($p < 0,05$), гиперозидом на 34,9% ($p < 0,05$), глицистеином на 26,9% ($p < 0,05$), хризантемном на 27,3% ($p < 0,05$), теафлавином на 70,5% ($p < 0,05$), галловой кислотой на 22,8% ($p < 0,05$). В сравнении с куркумином статистически значимых отличий не наблюдалось. Количество актов груминга при применении мальвидина было статистически значимо ниже в сравнении с диосмином на 44,4% ($p < 0,05$), гесперидином на 28,9% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 20,8% ($p < 0,05$), кофейной кислотой 69,6% ($p < 0,05$), гиперозидом на 37,3% ($p < 0,05$), глицистеином на 67,5% ($p < 0,05$), хризантемином на 42,5% ($p < 0,05$), теафлавином на 67,7% ($p < 0,05$), галловой кислотой на 59,6% ($p < 0,05$), коричной кислотой на 37,3% ($p < 0,05$). При сравнении с хризинном статистически значимых отличий не обнаружено. Число переходов на фоне введения мальвидина было статистически значимо выше относительно диосмина на 19,5% ($p < 0,05$), гесперидина на 37,7% ($p < 0,05$), хризина на 63,2% ($p < 0,05$), куркумина на 106,6% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 84,5% ($p < 0,05$), кофейной кислотой на 376,0% ($p < 0,05$), гиперозидом на 98,65% ($p < 0,05$), глицистеином на 42,5% ($p < 0,05$), хризантемином на 84,5% ($p < 0,05$), теафлавином на 244,3% ($p < 0,05$), галловой кислотой на 203,8% ($p < 0,05$), коричной кислотой на 169,7% ($p < 0,05$). При введении крысам мальвидина количество свешиваний животных также было увеличено в сравнении с куркумином на 92,5% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 126,4% ($p < 0,05$), кофейной кислотой на 77,8% ($p < 0,05$), гиперозидом на 83,3% ($p < 0,05$), глицистеином на 136,9% ($p < 0,05$), хризантемином на 24,19% ($p < 0,05$), теафлавином на 188,4% ($p < 0,05$), галловой кислотой на 160,4% ($p < 0,05$), коричной кислотой на 77,8% ($p < 0,05$). Число стоек у крыс, получавших мальвидин, также было статистически значимо увеличено в сравнении с диосмином на 74,0% ($p < 0,05$), гесперидином на 52,35% ($p < 0,05$), хризинном на 70,9%, куркумином на 125,4% ($p < 0,05$), сорбиновой кислотой на 235,4% ($p < 0,05$), кофейной

кислотой на 108,8%, гиперозидом на 135,0% ($p < 0,05$), глицитеином на 147,3% ($p < 0,05$), теафлавином на 413,6% ($p < 0,05$), галловой кислотой на 135,0% ($p < 0,05$), коричной кислотой на 108,8% ($p < 0,05$). При сравнении с хризантемином статистически значимых отличий не выявлено.

3.5. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на величину зоны некроза, степень гидратации головного мозга в условиях ишемии

У группы ЛО крыс содержание воды в ткани головного мозга составляло 73,45%. Спустя 72 часа после моделирования ишемии у НК крыс отмечено развитие отека головного мозга, выражающегося в увеличении содержания воды головного мозга на 15,3% ($p < 0,05$) (Таблица 7). После воспроизведения фокальной ишемии головного мозга у НК крыс относительно ЛО зона некроза составила $52,38 \pm 3,03\%$.

На фоне введения крысам мексидола отмечено, что объем зоны некроза головного мозга составил $28,56 \pm 3,83$ – т.е. уменьшился на 45,5% ($p < 0,05$) относительно группы животных НК ($52,38 \pm 3,03$). При этом мексидол способствовал уменьшению отека головного мозга на 8,56% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК (Таблица 7).

Аналогичная тенденция изменений наблюдалась и при введении ацетилцистеина. Так, в сравнении с группой крыс НК введение ацетилцистеина животным способствовало снижению зоны некроза, которая составила $27,80 \pm 1,055$ – уменьшилась на 46,92% ($p < 0,05$) и уменьшению отека головного мозга на 11,05% ($p < 0,05$) (Таблица 7).

Таблица 7 – Оценка влияния исследуемых соединений и препаратов сравнения на размер зоны некроза и уровень гидратации головного мозга

Группы (n=6)	Некроз (%)	Отек (%)
ЛО		$73,45 \pm 1,405$

НК	52,38±3,03#	84,69± 1,685#
Мексидол	28,56±1,65*(45,5%)	77,44 ± 1,98*(8,56%)
Ацетилцистеин	27,80±1,055*(46,9%)	75,33 ±1,09*(11,05%)
Куркумин	54,8±0,747	81,25 ± 0,4
Галловая кислота	46,61±2,425	77,05 ± 1,43*
Коричная кислота	37,99±1,507*(27,47%)	78,26 ± 0,6* (7,59%)
Теафлавин	37,82±1,414*(27,7%)	81,18 ± 0,315
Хризантемин	37,56±1,965*(28,29%)	75,83 ± 0,73*(10,46%)
Глицитеин	37,30±1,937*(28,7%)	81,01 ± 1,86
Диосмин	34,85±1,864*(33,46%)	77,365 ±0,675*(8,65%)
Гиперозид	34,65±0,753*(33,85%)	78,65 ± 1,285*
Сорбиновая кислота	34,31±1,029*(34,5%)	76,19 ± 0,685*(10,0%)
Гесперидин	31,27±0,765*(40,3%)	77,29 ± 0,47*(8,74%)
Хризин	28,07±3,121*(46,4%)	77,43 ± 0,99*(8,57%)
Мальвидин	24,21± 0,979*(53,78%)	75,51 ± 0,51*(10,83%)
Кофейная кислота	23,51±1,5*(55,1%)	76,24 ± 0,61*(9,97%)

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

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

% - уменьшение размера зоны некроза и отека головного мозга по сравнению с группой НК.

После введения куркумина крысам не наблюдалось статистически значимого уменьшения отека и некроза головного мозга в сравнении с группой крыс НК. (Таблица 7).

Галловая кислота приводила к уменьшению некроза головного мозга в сравнении с группой крыс НК на 11,01% ($p < 0,05$) соответственно.

При введении крысам коричной кислоты, зона некроза и степень отека головного мозга уменьшились на 27,47% ($p < 0,05$) и 7,59% ($p < 0,05$) соответственно относительно группы животных НК (Таблица 7).

Введение животным теафлавина и хризантемина способствовало уменьшению размера зоны некроза головного мозга на 27,7% ($p < 0,05$) и 28,29% ($p < 0,05$) соответственно относительно группы крыс НК. На фоне введения крысам хризантемина также наблюдалось снижение отека головного мозга на 10,46% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК (Таблица 7). При введении теафлавина не отмечено статистически значимого снижения отека головного мозга в сравнении с группой НК.

Глицитеин и диосмин уменьшали зону некроза головного мозга на 28,7% ($p < 0,05$) и 33,46% ($p < 0,05$). На фоне введения диосмина также отмечено снижение гидратации головного мозга на 8,65% ($p < 0,05$), соответственно, относительно группы крыс НК (Таблица 7). При введении глицитеина не отмечено статистически значимого снижения отека головного мозга в сравнении с группой НК.

После введения крысам гиперозида и сорбиновой кислоты зона некроза ткани головного мозга была уменьшена на 33,85% ($p < 0,05$) и 34,5% ($p < 0,05$) относительно группы животных НК. Также было отмечено снижение отека головного мозга на 7,13% и 10% ($p < 0,05$), относительно группы крыс НК (Таблица 7).

В сравнении с группой животных НК введение крысам гесперидина и хризина способствовало уменьшению очага некроза головного мозга на 40,3% ($p < 0,05$) и 46,4% ($p < 0,05$) соответственно. Гесперидин и хризин способствовали снижению отека головного мозга крыс в относительно группы животных НК на 8,74% ($p < 0,05$) и 8,57% ($p < 0,05$) соответственно (Таблица 7).

На фоне введения крысам мальвидина и кофейной кислоты отмечено уменьшение зоны некроза ткани головного мозга на 53,78% ($p < 0,05$) и 55,11% ($p < 0,05$) соответственно относительно группы крыс НК. Также введение данных соединений способствовало уменьшению гидротации

головного мозга крыс в сравнении с группой крыс НК: мальвидин – на 10,83% ($p < 0,05$), кофейная кислота – 9,97% ($p < 0,05$) (Таблица 7). Мальвидин приводил к уменьшению зоны некроза на 15,23% ($p < 0,05$) и 12,9% ($p < 0,05$) больше, чем мексидол и ацетилцистеин.

Кофейная кислота приводила к уменьшению зоны некроза на 55,11% ($p < 0,05$) и 9,97% ($p < 0,05$) относительно групп крыс, получавших мексидол и ацетилцистеин.

3.6. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на концентрацию молочной, пировиноградной кислот и гомоцистеина в сыворотке крови животных в условиях фокальной ишемии головного мозга

Концентрация лактата, пирувата и гомоцистеина в сыворотке крови у ЛО группы крыс составила $1,08 \pm 0,1$ ммоль/л, $100,38 \pm 1,144$ мкмоль/л и $10,27 \pm 0,675$ мкмоль/л. По истечении 72-х часового ишемического периода было отмечено увеличение концентрации лактата, пирувата и гомоцистеина у НК группы крыс на 176,85% ($p < 0,05$), 99,92% ($p < 0,05$) и 352,19% ($p < 0,05$) относительно группы ЛО животных (Таблица 8).

На фоне введения крысам мексидола наблюдалось уменьшение образования лактата, пирувата и гомоцистеина на 14,04% ($p < 0,05$), 42,19% ($p < 0,05$) и 43,45% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК (Таблица 8).

Введение животным ацетилцистеина способствовало уменьшению концентрации лактата на 40,13% ($p < 0,05$), пирувата на 51,53% ($p < 0,05$) и гомоцистеина на 43,93% ($p < 0,05$), в сравнении с группой крыс НК (Таблица 8).

Таблица 8 – Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнений на концентрацию молочной, пировиноградной кислот и

гомоцистеина в сыворотке крови в условиях фокальной церебральной ишемии

Группы, (n=6)	Лактат, моль/л	Пируват, мкмоль/л	Гомоцистеин, мкмоль/л
ЛО	1,08 ±0,1	100,38±1,144	10,27±0,675
НК	2,99±0,24#	200,68±15,601#	46,44±1,054#
Мексидол	2,57±0,16* (14,4%)	116,0±2,63* (42,19%)	26,65±1,018* (43,45%)
Ацетилцистеин	1,79±0,208* (40,13%)	97,26±2,818* (51,53%)	26,04±1,233* (43,93%)
Гесперидин	2,59±0,099* (13,37%)	110,41±7,769* (44,98%)	31,53±1,812* (32,1%)
Диосмин	2,37±0,105* (20,7%)	92,38±3,413* (3,97%)	32,29±1,081* (30,47%)
Хризантемин	2,65±0,11* (11,37%)	97,87±6,127* (57,95%)	36,64±1,19* (12,25%)
Хризин	2,77±0,124	84,38±4,937* (51,23%)	40,75±1,502* (21,1%)
Мальвидин	2,15±0,094* (28,1%)	106,64±3,19* (46,86%)	31,46±1,259* (32,26%)
Куркумин	2,72±0,125	149,95±2,817* (25,27%)	27,9±2,524* (39,92%)
Теафлавин	2,24±0,068* (25,08%)	116,89±5,82* (41,75%)	26,75±1,617* (42,39%)
Сорбиновая кислота	2,3±0,034* (23,07%)	104,41±5,82* (47,97%)	27,2±0,45* (41,43%)
Кофейная кислота	2,13±0,04* (28,76%)	102,07±3,48* (49,17%)	29,07±1,303* (37,4%)
Галловая кислота	2,02±0,079* (32,44%)	150,51±3,787* (25,0%)	36,0±0,863* (22,48%)
Коричная кислота	1,31±0,017 *(56,18%)	129,9±6,969* (32,27%)	28,65±1,251* (38,3%)
Глицитеин	1,7±0,029* (43,14%)	165,44±4,805	41,94±1,074* (9,69%)
Гиперозид	1,41±0,019* (52,84%)	117,96±8,748* (41,22%)	25,88±1,258* (42,27%)

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

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

На фоне введения крысам гесперидина наблюдалось снижение концентрации лактата, пирувата и гомоцистеина на 13,37% ($p < 0,05$), 44,98% ($p < 0,05$) и 32,1% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК (Таблица 8).

Аналогичная картина складывалась и у животных, получавших диосмин. Так, концентрация лактата, пирувата и гомоцистеина у животных, получавших диосмин, была ниже на 20,7% ($p < 0,05$), 53,97% ($p < 0,05$) и 30,47% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК. При введении крысам диосмина не наблюдалось статистически значимого снижения накопления пирувата относительно группы животных, получавшей мексидол и ацетилцистеин (Таблица 8).

На фоне введения крысам хризина и хризантемина отмечено снижение образования лактата на 11,37% ($p < 0,05$) и 7,35% ($p < 0,05$), пирувата на 51,23% ($p < 0,05$) и 57,95% ($p < 0,05$), гомоцистеина на 21,1% ($p < 0,05$) и 12,25% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. Стоит отметить, что относительно группы крыс, получавшей мексидол, хризантемина крысам вызывало уменьшение концентрации пирувата в сыворотке крови на 27,25% ($p < 0,05$). Хризин способствовал понижению концентрации пирувата на 15,6% ($p < 0,05$) относительно группы крыс, получавшей мексидол (Таблица 8).

Относительно группы животных НК у крыс, получавших мальвидин, было отмечено понижение концентрации лактата, пирувата и гомоцистеина на 28,1% ($p < 0,05$), 46,86% ($p < 0,05$) и 32,26% ($p < 0,05$) соответственно. Отметим, что у крыс, получавших мальвидин, концентрация пирувата в сыворотке крови крыс была ниже на 8,8% ($p < 0,05$) относительно группы животных, которой вводили мексидол. В сравнении с группой, получавшей мексидол, у группы, получавшей мальвидин наблюдалось уменьшение лактата в крови на 16,34% ($p < 0,05$) (Таблица 8).

Куркумин привел к снижению пирувата и гомоцистеина на 25,27% ($p < 0,05$) и 39,92% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК (Таблица 8). При введении куркумина крысам статистически значимого снижения лактата не отмечено.

Теафлавин снижал концентрацию лактата, пирувата и гомоцистеина на 25,08% ($p < 0,05$), 41,75% ($p < 0,05$) и 42,39% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК.

У крыс, которым вводили сорбиновую кислоту концентрация лактата, пирувата и гомоцистеина была ниже на 23,07% ($p < 0,05$), 47,97% ($p < 0,05$) и 41,43% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК.

На фоне введения крысам кофейной кислоты наблюдалось снижение концентрации лактата, пирувата и гомоцистеина на 28,76% ($p < 0,05$), 49,17% ($p < 0,05$) и 37,4% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК.

После введения крысам галловой кислоты, концентрация лактата, пирувата и гомоцистеина была ниже на 32,44% ($p < 0,05$), 25% ($p < 0,05$) и 22,48% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК. Относительно группы крыс, которой вводили мексидол, концентрация лактата у крыс, получавших галловую кислоту, была ниже на 21,4% ($p < 0,05$) (Таблица 8).

Концентрация лактата, пирувата и гомоцистеина в сыворотке крови животных, получавших коричную кислоту, была ниже на 56,18% ($p < 0,05$), 35,27% ($p < 0,05$) и 38,3% ($p < 0,05$) соответственно относительно группы крыс НК. Необходимо отметить, что в сравнении с группами крыс, которым вводили мексидол, концентрация лактата в крови у крыс, получавших коричную кислоту была меньше на 49,02% ($p < 0,05$) соответственно.

На фоне введения глицистеина также было отмечено снижение концентрации лактата и гомоцистеина на 43,14% ($p < 0,05$) и 9,69% ($p < 0,05$) относительно группы животных НК. Глицистеин не привел к статистически значимому снижению пирувата относительно группы НК. В сравнении с группами крыс, получавших мексидол, концентрация лактата в крови у

крыс, получавших глицитеин была уменьшена на 33,8% ($p < 0,05$) (Таблица 8).

Введение гиперозида крысам уменьшало концентрацию лактата на – 52,84% ($p < 0,05$), пирувата на – 41,22% ($p < 0,05$) и гомоцистеина на – 44,27% ($p < 0,05$) в сравнении с группой животных НК. Также у крыс, получавших гиперозид, концентрация лактата была меньше на 45,13% ($p < 0,05$) относительно групп животных, получавших мексидол.

Заключение

Данные, полученные в результате фармакологического исследования, позволяют установить, что ишемия головного мозга, моделированная методом окклюзии правой средней мозговой артерии, приводит к отеку, некрозу головного мозга, нарушению энергообмена, а также к неврологическому дефициту. Так, у группы крыс НК по отношению к группе ЛО животных отек увеличился на 15,3%, а зона некроза составила $52,38\% \pm 3,03$. Нарушение энергообмена у группы крыс НК выразалось в увеличении уровня молочной ($2,99 \pm 0,24$ ммоль/л), пировиноградной ($200,68 \pm 15,601$ мкмоль/л) кислот и гомоцистеина ($46,44 \pm 1,054$ мкмоль/л).

Фокальная церебральная ишемия способствовала изменению поведенческой, двигательной активности крыс по отношению к группе животных ЛО. Ориентировочно-исследовательская активность животных группы НК была снижена по отношению к группе ЛО животных, что проявлялось в уменьшении числа пройденных квадратов (горизонтальная активность) в 2,27 раза ($p < 0,05$), стоек (вертикальная активность) в 3 раза ($p < 0,05$) и заглядываний в норки в 5,7 раза ($p < 0,05$). Ухудшение эмоционального состояния крыс после моделирования ишемического повреждения выразалось в увеличении времени нахождения крысы в центральном квадрате (в 13 раз ($p < 0,05$)) и в увеличении актов груминга (в 3,59 раза ($p < 0,05$)) относительно группы крыс ЛО.

Уровень тревожности крыс группы НК был увеличен, что показывают данные теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Соответственно,

нахождение животных в открытых рукавах было понижено (в 2 раза ($p < 0,05$)), в закрытых повышено – в 1,25 раза ($p < 0,05$), а количество актов груминга повысилось в 5,84 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс ЛО. Говоря о двигательной активности в тесте ПКЛ, стоит отметить, что ДА была снижена, что соответствует данным теста «Открытое поле».

В тесте экстраполяционного избавления латентное время подныривания крыс повышалось в 3,45 раз ($p < 0,05$) в сравнении с группой ЛО крыс. Результаты теста условной реакции пассивного избегания показали, что на фоне ишемии головного мозга сохранение памятного следа у крыс ухудшалось, о чем свидетельствует понижение времени захода крыс группы НК в темный отсек относительно группы ЛО в 28,57 раза ($p < 0,05$).

Введение препаратов сравнения улучшало функциональное и метаболическое состояние головного мозга на фоне фокальной ишемии. Стоит подчеркнуть, что оба препарата – мексидол и ацетилцистеин практически в равнозначных степенях уменьшали некроз, отек, концентрации лактата, пирувата и гомоцистеина в головном мозге, а также проявления неврологического дефицита.

Сопоставляя данные, полученные при изучении 13 соединений, установлено, что наиболее эффективным оказалось соединение, представляющее собой антоциан – мальвидин. Так, например, по влиянию на степень некроза и гидратацию головного мозга, мальвидин превосходил препараты сравнения: мексидол (на 17,96% ($p < 0,05$) и 19,5% ($p < 0,05$)) и ацетилцистеин (на 14,8% ($p < 0,05$)). Мальвидин способствовал снижению концентрации лактата (на 28,1% ($p < 0,05$), пирувата (на 46,86% ($p < 0,05$)) и гомоцистеина (на 32,26% ($p < 0,05$)) относительно группы НК, что указывает на то, что мальвидин превзошел мексидол.

В тестах «Открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» мальвидин также эффективнее, чем мексидол и ацетилцистеин влиял на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность: по отношению к мексидолу количество пройденных квадратов, стоек и

заглядываний было увеличено на 34,8% ($p < 0,05$), 22,17% ($p < 0,05$) и 48% ($p < 0,05$), по отношению к ацетилцистеину количество пройденных квадратов увеличилось на 30,4% ($p < 0,05$).

Улучшение энергообмена, уменьшении зоны некроза, гидратации головного мозга, а также улучшение поведенческой, эмоциональной активности крыс на фоне фокальной ишемии, вероятно, связаны с антиоксидантными свойствами флавоноидов, что сопоставимо с литературными источниками [207-212]. Исходя из данных, полученных в ходе фармакологического скрининга, в качестве соединения – лидера для проведения дальнейших экспериментов было выбрано соединение мальвидин.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ МАЛЬВИДИНА НА СТЕПЕНЬ НЕКРОЗА ГОЛОВНОГО МОЗГА, КОНЦЕНТРАЦИЮ ЛАКТАТА И ПИРУВАТА

Эффективность проводимой фармакотерапии во многом определяется оптимальным режимом дозирования лекарственного средства. Известно, что существует зависимость величины фармакологического эффекта от дозы вводимого лекарственного средства в организм [213].

Но зависимость фармакологического эффекта от дозы не всегда является линейной, что часто увеличивает риск возникновения нежелательных побочных эффектов, вплоть до токсического действия препарата [214, 215].

Из этого следует, что важным этапом исследования новых фармакологически активных веществ является оценка дозозависимого эффекта соединения.

Изучение зависимости «доза-эффект» для соединения лидера проводилось в пяти вариациях дозирования: 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг, 200 мг/кг, путем определения влияния этих доз на размер зоны некроза головного мозга, концентрацию молочной и пировиноградной кислот.

4.1 Оценка влияния различных доз мальвидина на изменение зоны некроза головного мозга

При введении мальвидина крысам в дозе 25 мг/кг и 50 мг/кг отмечалось уменьшение зоны некроза головного мозга на 31,92% ($p < 0,05$) и 33,43% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК (Рисунок 10).

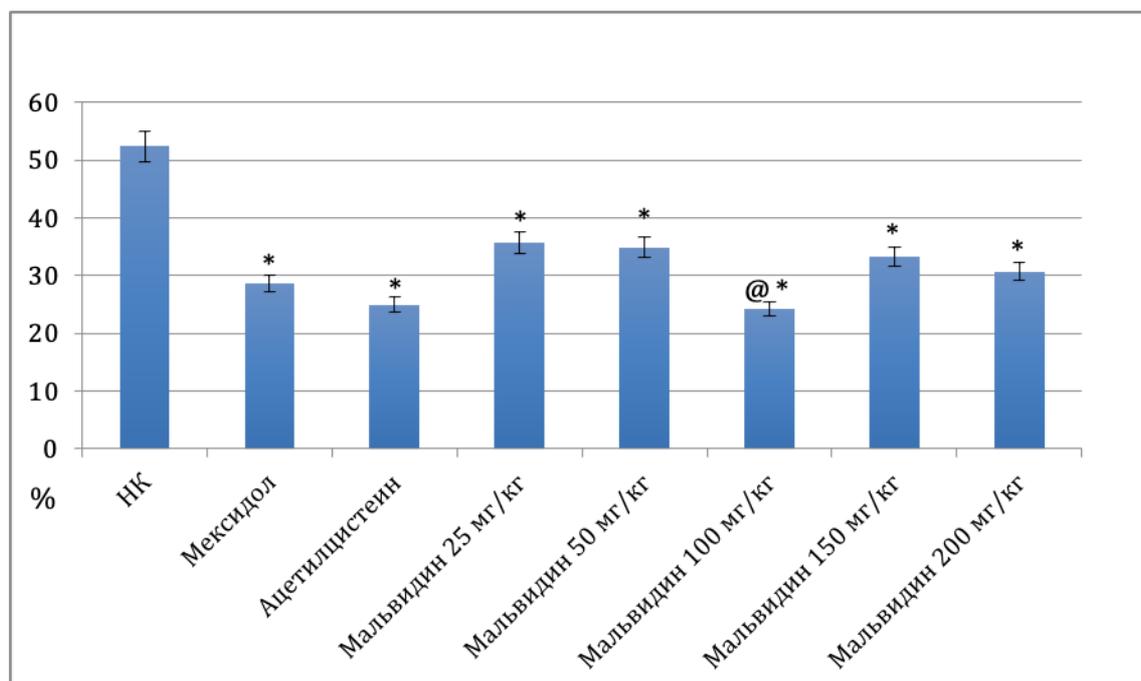


Рисунок 10 – Влияние различных доз мальвидина на степень зоны некроза головного мозга

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

@ - статистически значимо относительно группы животных, получавшей мексидол (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).

В сравнении с группой животных НК, мальвидин в дозе 150 мг/кг и 200 мг/кг уменьшал зону некроза на 36,44% ($p < 0,05$) и 41,4% ($p < 0,05$), тогда как мальвидин в дозе 100 мг/кг способствовал уменьшению зоны некроза на 53,78% ($p < 0,05$), также относительно группы крыс НК (Рисунок 10).

Степень некроза у животных, которым вводили мальвидин в дозе 100 мг/кг была ниже на 32,1% ($p < 0,05$) и на 30,57% ($p < 0,05$) относительно групп крыс, получавшим мальвидин в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг. Этот же показатель у группы особей, которым вводили мальвидин в дозе 100 мг/кг, был меньше на 27,2% ($p < 0,05$) и на 21,1% ($p < 0,05$) в сравнении с группами крыс, которые получали мальвидин в дозах 150 мг/кг и 200 мг/кг. Введение мальвидина в дозе 100 мг/кг вызывало снижение степени некроза на 15,2% ($p < 0,05$) относительно группы крыс, получавшей мексидол.

4.2 Оценка влияния различных доз мальвидина на концентрацию молочной, пировиноградной кислот в сыворотке крови в условиях фокальной церебральной ишемии

Мальвидин в минимально выбранной дозе (25 мг/кг) понижал лактат в крови на 15,7% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. В дозе 50 мг/кг мальвидин уменьшал содержание лактата в сыворотке крови на 19,39% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК. Мальвидин в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг не влиял на концентрацию пирувата в сыворотке крови (Таблица 9).

Таблица 9 – Изменение концентрации лактата и пирувата в сыворотке крови после воспроизведения церебральной ишемии головного мозга крыс и на фоне введения препаратов сравнения и мальвидина в различных дозах

Группы крыс, (n=10)	Исследуемый показатель	
	Лактат, ммоль/л	Пируват, мкмоль/л
ЛО	1,08±0,1	100,38±1,44
НК	2,99±0,024#	200,68±15,60#
Мексидол	2,57±0,161*	116,0±3,6*
Ацетилцистеин	2,05±0,046*	151,76±18,818*
Мальвидин, 25 мг/кг	2,52±0,135*	287,29±22,238
Мальвидин, 50 мг/кг	2,41±0,048*	230,16±9,086
Мальвидин, 100 мг/кг	2,15±0,091*@	106,64±2,0*@&
Мальвидин, 150 мг/кг	2,52±0,135*	282,67±37,137
Мальвидин, 200 мг/кг	2,47±0,107*	304,46±11,258

Примечание: ЛО – группа ложнооперированных крыс, НК – группа крыс негативного контроля

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

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

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

@ - статистически значимо относительно группы животных, получавшей мексидол (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).

Мальвидин в дозах 150 мг/кг и 200 мг/кг вызывал снижение уровня лактата в сравнении с группой животных НК на 15,72% ($p < 0,05$) и 17,39% ($p < 0,05$) соответственно. В дозах 150 мг/кг и 200 мг/кг мальвидин не оказывал влияния на дальнейшее уменьшение пирувата в крови.

Мальвидин в дозе 100 мг/кг прив к уменьшению лактата и пирувата в сыворотке крови на 28,09% ($p < 0,05$) и 46,86% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК.

У крыс, получавших мальвидин в дозе 100 мг/кг, концентрация молочной кислоты была ниже на 14,68% ($p < 0,05$) и на 10,78% ($p < 0,05$) относительно группы животных, которые получали мальвидин в дозе 25 мг/кг и 50 мг/кг. Мальвидин в дозе 100 мг/кг способствовал более выраженному снижению лактата на 14,68% ($p < 0,05$) и на 12,95% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс, получавших мальвидин в дозах 150 мг/кг и 200 мг/кг.

Мальвидин в дозе 100 мг/кг оказалось эффективнее не только относительно группы крыс НК, но и относительно групп животных, которые в качестве фармакологической поддержки получали референтные препараты. Так, в сравнении с группой животных, которым вводили мексидол, у группы крыс, получавших мальвидин в дозе 100 мг/кг, размер зоны некроза головного мозга был ниже на 15,23% ($p < 0,05$) (Таблица 10). По сравнению с группой крыс, получавшей мексидол, введение мальвидина крысам в дозе 100 мг/кг снижало концентрацию лактата и пирувата на 15,23% ($p < 0,05$) и 8,06% ($p < 0,05$) больше.

Заключение

В ходе дозозависимого изучения церебропротективной активности соединения лидера было установлено, что максимальный фармакологический эффект мальвидина отмечен в дозе 100 мг/кг. Так, относительно группы животных, получавших мексидол, мальвидин снижал накопление лактата и пирувата на 15,23% ($p < 0,05$) и 8,06% ($p < 0,05$). По

сравнению с группой крыс, которой вводили ацетилцистеин, введение мальвидина вызывало снижение образования пирувата на 29,73% ($p < 0,05$).

Таким образом, нужно подчеркнуть, что из пяти разных дозировок соединения-лидера (25 мг/кг; 50 мг/кг; 100 мг/кг; 150 мг/кг и 200 мг/кг) наиболее эффективной оказалась доза 100 мг/кг, что выражено в максимальном уменьшении размера зоны некроза в данной дозе.

ГЛАВА 5. ВЫЯСНЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ МАЛЬВИДИНА

5.1. Исследование эндотелиопротекторного действия мальвидина в условия фокальной церебральной ишемии

5.1.1. Влияние соединения лидера мальвидина и препаратов сравнения на вазодилатирующую функцию сосудистого эндотелия в условиях фокальной церебральной ишемии

Острый период ишемического инсульта сопровождается стойкой эндотелиальной дисфункцией, которая выражается в высоких изменениях биохимических маркеров дисфункции эндотелия, атромбогенного потенциала сосудистой стенки в виде снижения ее антиагрегационной, антикоагулянтной и фибринолитической активности, а также нарушением вазодилатирующей функции эндотелия и снижением скорости мозгового кровотока [216].

Было проведено исследование состояния эндотелия сосудов на фоне фокальной ишемии головного мозга, в рамках которого изучали влияние мальвидина на вазодилатирующую функцию эндотелия и агрегационную активность тромбоцитов.

У группы ЛО крыс в ответ на введение АЦХ наблюдалось увеличение скорости мозгового кровотока на 46,9% ($p < 0,05$) в сравнении с исходным значением скорости кровотока у данной группы крыс ($3,5 \pm 0,153$ см/сек.). На фоне введения L – аргинина скорость церебрального кровотока не повышалась статистически значимо относительно исходной СК, однако наблюдалось восстановление скорости кровотока до исходного значения (Рисунок 11). При этом ингибирование ферментных систем синтеза NO посредством L-NAME снижало скорость кровотока на 23,7% ($p < 0,05$).

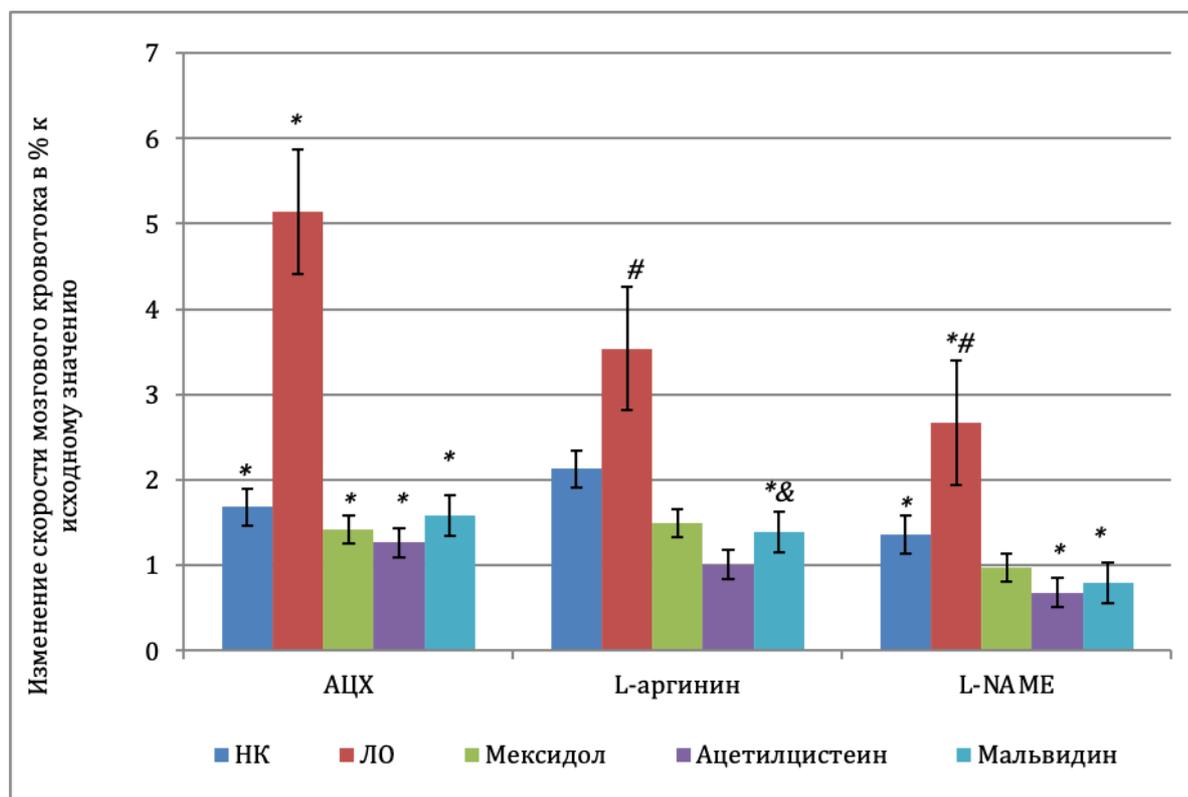


Рисунок 11 – Относительное изменение скорости локального мозгового кровотока в ответ на введение эндотелий - специфичных анализаторов

Примечание: * – статистически значимо относительно исходного значения ($p < 0,005$); # – статистически значимо относительно НК ($p < 0,005$); @ – статистически значимо относительно мексидола ($p < 0,005$); & – статистически значимо относительно ацетилцистеина ($p < 0,005$).

У группы животных НК исходная скорость мозгового кровотока была $1,52 \pm 0,072$ см/сек. Относительно группы ЛО крыс данный показатель был ниже на 57,1% ($p < 0,005$). После введения АЦХ крысам наблюдалось увеличение СК на 12% ($p < 0,005$). Стоит отметить, что при введении животным L – аргинина происходило повышение скорости мозгового кровотока на 41,3% ($p < 0,005$) в сравнении с исходным показателем, это говорит о развитии феномена «L – аргининового парадокса» у группы крыс НК. После введения L-NAME скорость мозгового кровотока была снижена на 10% ($p < 0,005$) (Рисунок 11).

Скорость локального мозгового кровотока у животных, получавших в

качестве фармакологической поддержки мексидол, составила $0,986 \pm 0,16$. При введении АЦХ крысам было отмечено повышение СК на 41,9% ($p < 0,05$) относительно исходной СК у данной группы. В то же время введение крысам L – аргинина вызвало увеличение скорости мозгового кровотока на 51,1% ($p < 0,005$) относительно исходных данных СК у животных данной группы (Рисунок 11), тогда как L-NAME не приводил к статистически значимому понижению СК.

Исходная скорость мозгового кровотока у крыс, получавших ацетилцистеин, составила $0,94 \pm 0,3297$. Ответной реакцией на введение АЦХ животным, получавшим в качестве фармакологической поддержки ацетилцистеин, было увеличение СК на 35,1% ($p < 0,005$), а при введении L-NAME наблюдалось уменьшение скорости кровотока на 28,8% ($p < 0,005$) в сравнении с исходным значением СК у крыс этой группы. На фоне внутривенного введения L – аргинина крысам не замечено повышения скорости кровотока относительно исходных данных СК данной группы (Рисунок 11).

У крыс, получавших мальвидин, первоначальная скорость церебрального кровотока составила $1,15 \pm 0,160$. При введении АЦХ животным скорость кровотока была увеличена на 37,4% ($p < 0,05$) относительно исходной СК той же группы животных. По сравнению с группой НК ответ на введение АЦХ был сильнее в 3,49 раза ($p < 0,005$). После введения L – аргинина крысам, получавшим мальвидин, наблюдали рост скорости церебрального кровотока на 20,34% ($p < 0,005$), в сравнении с исходным значением СК. Падение СК в ответ на введение L-NAME данной группе крыс составила 31,3% ($p < 0,005$) (Рис.8). В сравнении с группой крыс НК этот показатель был ниже на 42% ($p < 0,005$). Мальвидин приводил к более выраженному сосудистому ответу, по сравнению с ацетилцистеином, что отражено в повышении мозгового кровотока на фоне введения АЦХ – на 24,4% ($p < 0,005$) и L – аргинина – на 18% ($p < 0,005$). В сравнении с группой, получавшей мексидол, мальвидин приводил к снижению скорости

кровотока на 18,5% ($p < 0,005$) в ответ на введение L-NAME.

5.1.2. Влияние соединения-лидера и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной церебральной ишемии

У группы ЛО животных степень и скорость агрегации тромбоцитов составили $1,25 \pm 0,077$ усл.ед. и $1,169 \pm 0,108$ усл.ед. (Таблица 10). После воспроизведения фокальной ишемии головного мозга у группы крыс НК отмечено значительное повышение степени агрегации тромбоцитов в 26,7 раза ($p < 0,05$), а скорости – в 27 раза ($p < 0,05$) (Таблица 10).

Таблица 10 – Изучение влияния соединения-лидера и препаратов сравнения на агрегационную активность тромбоцитов в условиях фокальной ишемии головного мозга

Группы, (n=10)	Степень агрегации (усл.ед.)	Скорость агрегации (усл.ед.)
ЛО	$1,25 \pm 0,077$	$1,169 \pm 0,108$
НК	$33,4 \pm 2,303\#$	$32,01 \pm 1,584\#$
Мексидол	$16,58 \pm 4,7^*$	$15,85 \pm 3,52^*$
Ацетилцистеин	$4,61 \pm 0,688^*$	$4,7 \pm 1,378^* \&$
Мальвидин	$5,67 \pm 0,930^* @$	$7,16 \pm 1,514^* @$

Примечание: # - статистически значимо относительно группы ЛО ($p < 0,05$);

** - статистически значимо относительно группы НК ($p < 0,05$); & - статистически значимо относительно группы животных, получавшей ацетилцистеин (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$); @ - статистически значимо относительно группы животных, получавшей мексидол (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).*

ЛО, - группа ложнооперированных животных;

НК – группа крыс негативного контроля;

Мексидол - группа животных, получавшая мексидол;

Ацетилцистеин – группа крыс, которой вводили ацетилцистеин;

Мальвидин – группа животных, получавшая мальвидин.

При использовании мексидола степень агрегации тромбоцитов в сравнении с группой НК животных снизилась в 2 раза ($p < 0,05$), скорость агрегации была снижена в 2,02 раза ($p < 0,05$).

На фоне применения ацетилцистеина степень и скорость агрегации тромбоцитов снизились относительно НК группы животных, соответственно, в 7,2 раза ($p < 0,05$) и в 6,8 раза ($p < 0,05$). У группы животных, которым вводили ацетилцистеин степень и скорость агрегации тромбоцитов была ниже относительно группы крыс, получавших мексидол в 3,6 раза ($p < 0,05$) и 3,4 раза ($p < 0,05$) (Таблица 10).

При введении крысам мальвидина степень агрегации тромбоцитов относительно НК группы животных снизилась в 5,9 раз ($p < 0,05$), а скорость в 4,5 раза ($p < 0,05$). В сравнении с эффектами мексидола, степень и скорость агрегации тромбоцитов была ниже в 2,9 раза ($p < 0,05$) и 2,2 раза ($p < 0,05$) (Таблица 10).

5.2. Исследование влияния соединения-лидера и препаратов сравнения на активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы) в условиях церебральной ишемии

Инактивация АФК происходит под действием внутриклеточной антиоксидантной системы, включающей ферментные (например, СОД, каталазу) и неферментативные антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, токоферолы) [217].

Однако церебральные повреждения в значительной степени способствуют выработке АФК, перегружая систему антиоксидантной защиты. Таким образом, усиление активности ферментов АОЗ является необходимой стратегией снижения окислительного стресса при ишемическом инсульте. СОД, каталаза и глутатионпероксидаза входят в число основных антиоксидантных ферментов, регулирующих

внутриклеточную антиоксидантную защиту, особенно в условиях инсульта [218].

В этой связи проводилось изучение влияния мальвидина на ферменты эндогенной антиоксидантной системы в условиях церебральной фокальной ишемии. В качестве антиоксидантных ферментов были выбраны (СОД, каталаза и глутатионпероксидаза).

Моделирование церебральной фокальной ишемии у крыс группы НК привело к снижению активности ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ) относительно ЛО группы животных. Так, на фоне ишемии головного мозга у крыс группы НК наблюдалось снижение активности супероксиддисмутазы на 76,9% ($p < 0,05$), глутатионпероксидазы на 76% ($p < 0,05$) и каталазы на 87,2% ($p < 0,05$) относительно группы крыс ЛО (Рисунок 12,13).

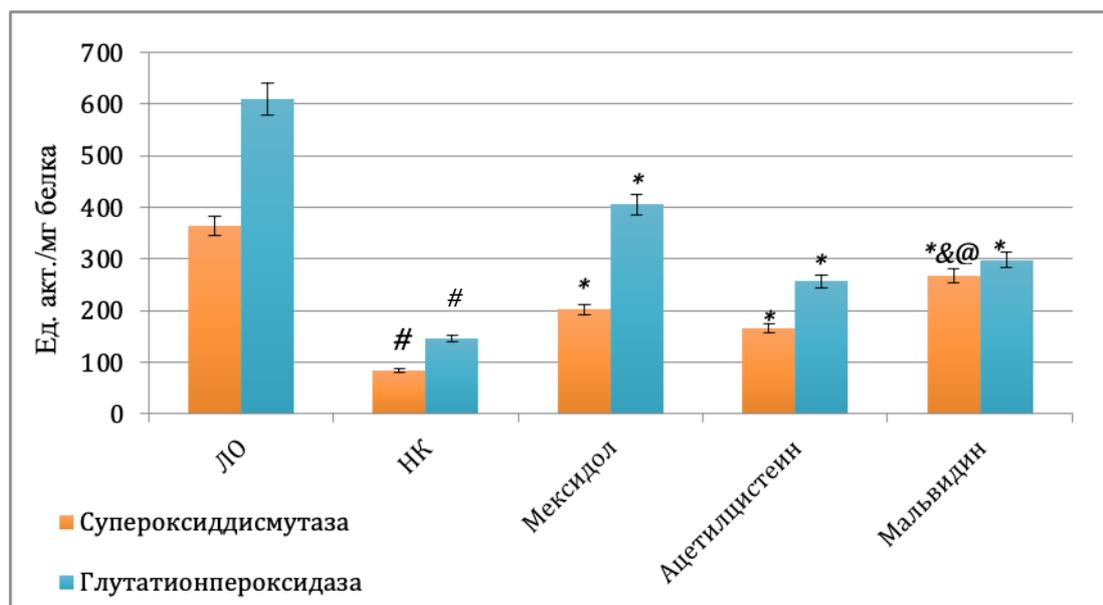


Рисунок 12 – Влияние препаратов сравнения и мальвидина на активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в супернатанте головного мозга крыс на фоне ишемии

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

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

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

@ - статистически значимо относительно группы животных, получавшей мексидол (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).

Препараты сравнения способствовали увеличению активности антиоксидантных ферментов относительно группы крыс НК. На фоне введения крысам мексидола было отмечено повышение активности СОД на 140,78% ($p < 0,05$), ГП на 178% ($p < 0,05$) и каталазы на 331,6% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК (Рисунок 13).

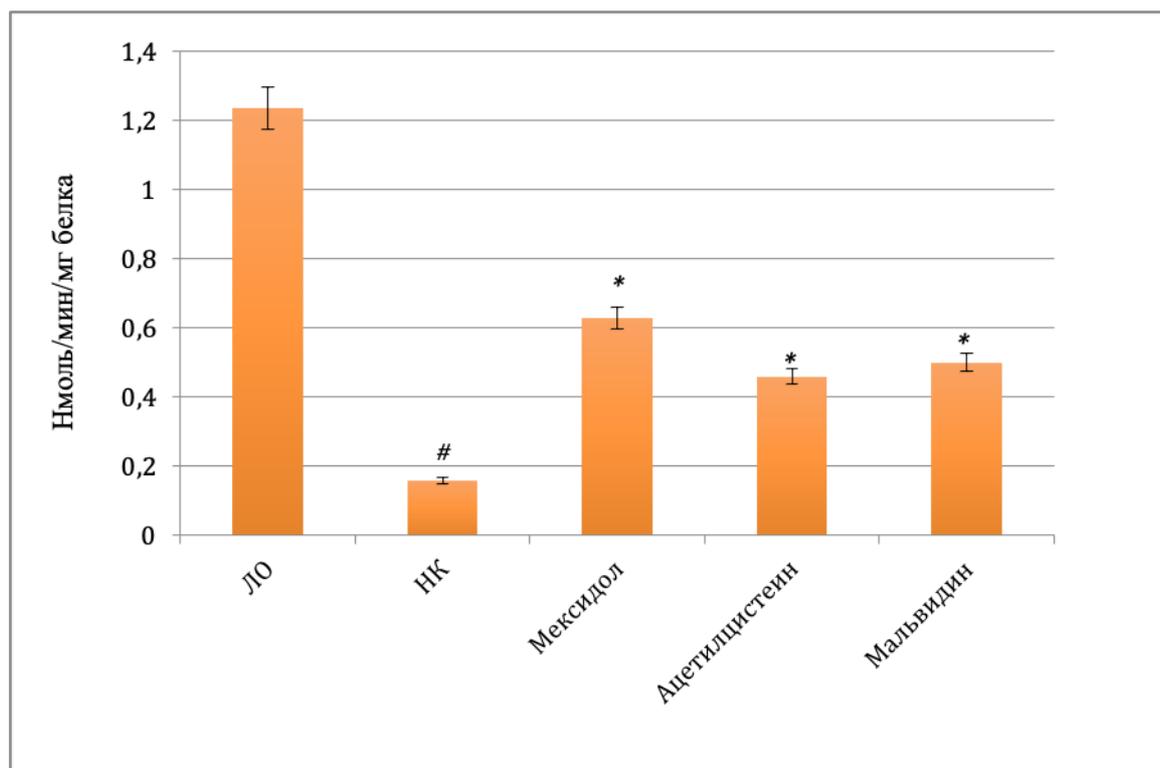


Рисунок 13 – Влияние препаратов сравнения и мальвидина на активность каталазы в супернатанте головного мозга крыс на фоне ишемии

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

У животных, получавших в качестве фармакологической поддержки ацетилцистеин, относительно группы крыс НК концентрация СОД была увеличена на 96,5% ($p < 0,05$), ГП на 76,13% ($p < 0,05$), каталазы на 213,3 % ($p < 0,05$).

Исследование влияния препарата сравнения – мальвидина на концентрацию ферментов антиоксидантной защиты в условиях церебральной ишемии крыс показало, что на фоне введения мальвидина

наблюдалось повышение активности ферментов относительно группы крыс НК: активности СОД на 217% ($p < 0,05$), ГП на 104,56% ($p < 0,05$), каталазы на 216,45 % ($p < 0,05$).

У группы крыс, принимавших мальвидин, активность СОД относительно группы, которой вводили мексидол была увеличена на 32,05% ($p < 0,05$). В сравнении с группой, получавшей ацетилцистеин этот показатель был повышен на 61,76% ($p < 0,05$) (Рисунок 13).

Изучение влияния мальвидина на концентрацию провоспалительных цитокинов – фактор некроза опухоли (ФНО- α) и интерлейкина-6 (ИЛ-6) в условиях фокальной ишемии головного мозга

Важными факторами, регулирующими процесс нейровоспаления в острый период инсульта, является группа провоспалительных (IL-1, IL-6, IL-8, ФНО- α) интерлейкинов. Недавние исследования продемонстрировали, что ингибирование провоспалительных цитокинов на фоне ишемического повреждения головного мозга оказывает церебропротекторную активность [56-61]. Сохранение функциональной активности нейронов головного мозга корректирует течение ишемического инсульта, а также определяет траекторию когнитивного статуса в восстановительном периоде. Соответственно, особое значение имеет изучение влияния мальвидина на некоторые маркеры воспаления (ИЛ-6, ФНО- α) в условиях ишемического инсульта [62, 63].

Так, у группы животных негативного контроля в условиях фокальной церебральной ишемии наблюдалось повышение содержания провоспалительных цитокинов по отношению к группе ложнооперированных крыс – ФНО- α на 48,4% ($p < 0,05$), ИЛ-6 на 18,4% ($p < 0,05$). Введение крысам препаратов сравнения способствовало снижению данных показателей относительно группы животных НК. Ацетилцистеин привел к понижению концентрации ФНО- α на 49,4% ($p < 0,05$), ИЛ-6 на 27,6% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК (Рисунок 14).

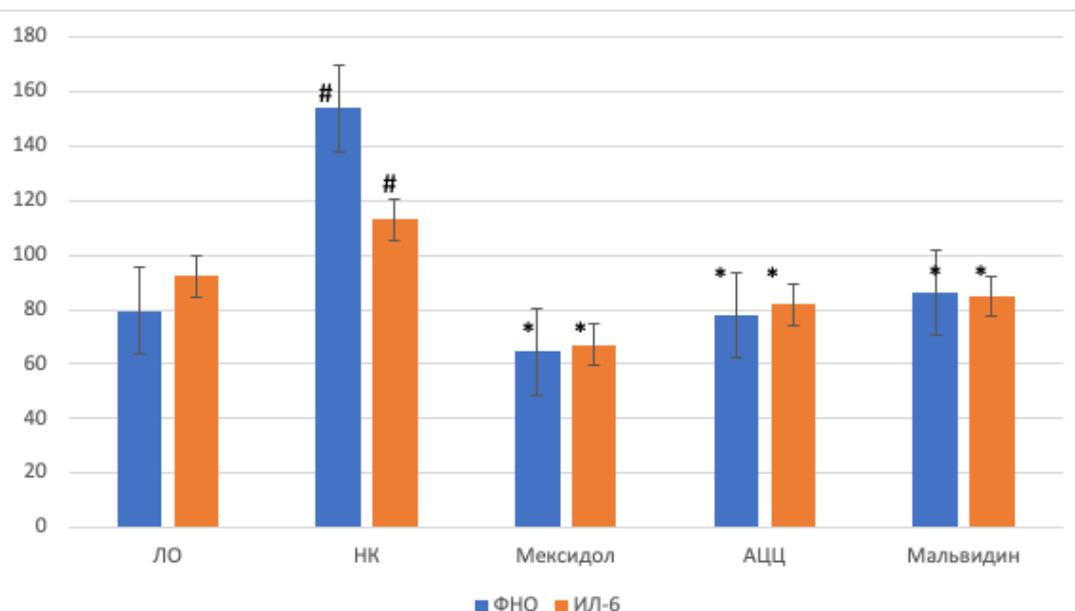


Рисунок 14 – Влияние мальвидина и препаратов сравнения на концентрацию ФНО-α, ИЛ-6

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

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

Введение мексидола крысам способствовало также снижению ФНО-α на 58% ($p < 0,05$), а ИЛ-6 на 40,7% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК. При введении соединения лидера мальвидина животным было отмечено, что содержание ФНО-α на 44% ($p < 0,05$) и ИЛ-6 на 25% ($p < 0,05$) статистически значимо снижалось по сравнению с группой крыс, не получавшей фармакологической поддержки. Сравнивая группы особей, которым вводили препараты сравнения и группу, получавшую мальвидин, статистически значимых отличий не выявлено.

5.3. Исследование влияния соединения-лидера и препаратов сравнения на респирометрическую функцию митохондрий в условиях церебральной ишемии

Значительную роль в патогенезе ишемического инсульта головного мозга играет митохондриальная дисфункция [219].

Известно, что ишемия/реперфузия нарушает работу митохондриальных комплексов ЭТЦ, митохондриального потенциала и митохондриальной поры. Дисфункция митохондрий приводит к избыточной генерации АФК, сбою в кальциевом обмене, синтезе АТФ, а также к апоптозу и даже некрозу [220-222].

Обладая антиоксидантными свойствами, мальвидин, вероятно, способен улучшать процессы, проходящие в митохондриях, что создает предпосылки рассматривать церебропротекцию, опосредованную сохранением функций митохондрий, как компетентную мишенью против ишемического повреждения [223, 224].

Основываясь на вышеизложенном, последующие эксперименты были направлены на изучение мальвидина, как вещества, способного улучшать респирометрическую функцию митохондрий в условиях фокальной церебральной ишемии. В ходе эксперимента было проведено три блока исследований, в совокупности характеризующих функцию митохондрий, а именно – изучение общей респирометрической функции митохондрий (АТФ-генерирующая способность, максимальный уровень дыхания и респирометрическая ёмкость); активность митохондриальных комплексов ЭТЦ (I, II, IV и V комплексы); активация гликолиза; оценка митохондриального мембранного потенциала и митохондриальной поры, а также концентрация кальция в гомогенате головного мозга.

5.3.1. Влияние соединения-лидера на респирометрическую функцию митохондрий в условиях фокальной ишемии головного мозга

У группы крыс НК относительно группы ЛО животных было отмечено снижение АТФ-генерирующей способности в 4,6 раза ($p < 0,05$). Также в условиях церебральной ишемии наблюдалось уменьшение максимального уровня дыхания и снижение респирометрической емкости относительно группы крыс ЛО в 2,85 раза ($p < 0,05$) и 2,13 раза ($p < 0,05$), соответственно (Рисунок 15).

На фоне введения животным мексидола, наблюдалось улучшение респирометрической функции митохондрий, которое проявлялось в увеличении АТФ-генерирующей способности, максимального уровня дыхания и респирометрической емкости. Так, АТФ-генерирующая способность у животных, получавших мексидол возросла в 9,64 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК, а максимальный уровень дыхания увеличился в 5,97 раза ($p < 0,05$), также было отмечено увеличение респирометрической емкости в 5,69 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК.

Ацетилцистеин приводил к увеличению АТФ-генерирующей способности в 3,28 раза ($p < 0,05$), увеличению максимального уровня дыхания в 3,6 раза ($p < 0,05$) и увеличению респирометрической емкости в 3,3 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс, получавших мексидол.

У крыс, получавших в качестве фармакологической коррекции мальвидин, также наблюдалось усиление респирометрической функции митохондрий. Например, относительно группы крыс НК, у крыс, которым вводили мальвидин, было отмечено повышение АТФ-генерирующей активности митохондрий в 35,83 раза ($p < 0,05$), а максимальный уровень дыхания увеличился в 23,38 раза ($p < 0,05$). Показатель респирометрической емкости митохондрий у крыс, получавших мальвидин также увеличился в 23,49 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК.

Исследуемое вещество мальвидин превзошел препараты сравнения по выраженности эффекта влияния на респирометрическую функцию митохондрий в условиях церебральной ишемии.

Введение мальвидина крысам вызывало увеличение АТФ-генерирующей способности митохондрий в 3,72 раза ($p < 0,05$) и повышение максимального уровня дыхания в 3,91 раза ($p < 0,05$), тогда как респирометрическая емкость усиливалась в 4,13 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс, получавших мексидол (Рисунок 15).

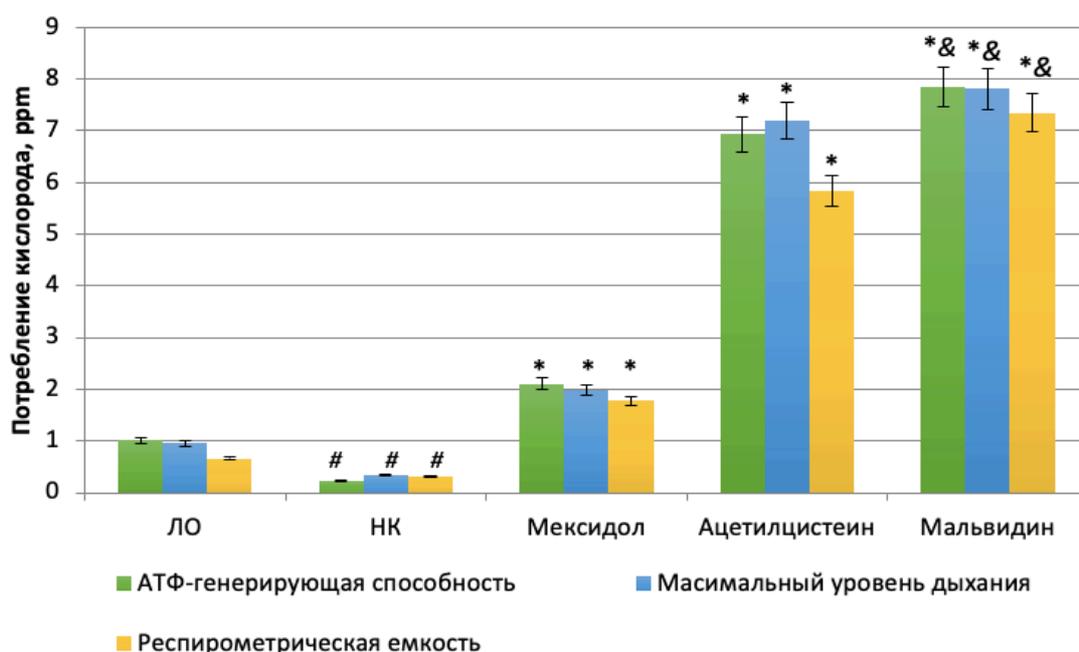


Рисунок 15 – Влияние препаратов сравнения и соединения-лидера на респирометрическую функцию митохондрий в условиях церебральной ишемии

Примечание: * - статистически значимо относительно группы НК животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); # - статистически значимо относительно группы ЛО животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,05$); & - статистически значимо относительно группы животных, получавшей ацетилцистеин (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).

5.3.2. Изменение процессов гликолиза на фоне введения препаратов сравнения и соединения-лидера в условиях церебральной ишемии

Моделирование церебральной ишемии головного мозга у крыс привело к увеличению интенсивности гликолиза относительно группы ЛО животных в 8,41 раза ($p < 0,05$). При этом у группы крыс НК отмечено снижение гликолитической емкости в сравнении с группой животных ЛО в 3,52 раза ($p < 0,05$). В тоже время показатель гликолитического резерва принимал отрицательное значение (Рисунок 16).

На фоне введения крысам мексидола установлено понижение интенсивности гликолиза в 9,63 раза ($p < 0,05$) и увеличение гликолитической емкости в 1,77 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. Также у животных, получавших мексидол, наблюдалось уменьшение гликолитического резерва в 1,95 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК.

У крыс, получавших в качестве фармакологической поддержки ацетилцистеин, также замечено уменьшение интенсивности гликолиза в 11,84 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. Стоит заметить, что показатели гликолитической емкости и гликолитического резерва были выше в 2,8 раза ($p < 0,05$) и 2,39 раза ($p < 0,05$) относительно группы животных НК.

При введении животным соединения-лидера также было отмечено уменьшение интенсивности гликолиза в 9,4 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс, не получавшей фармакологической поддержки. При этом, снова наблюдалось повышение гликолитической емкости и гликолитического резерва в 2,11 раза ($p < 0,05$) и 1,35 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно группы крыс НК (Рисунок 16).

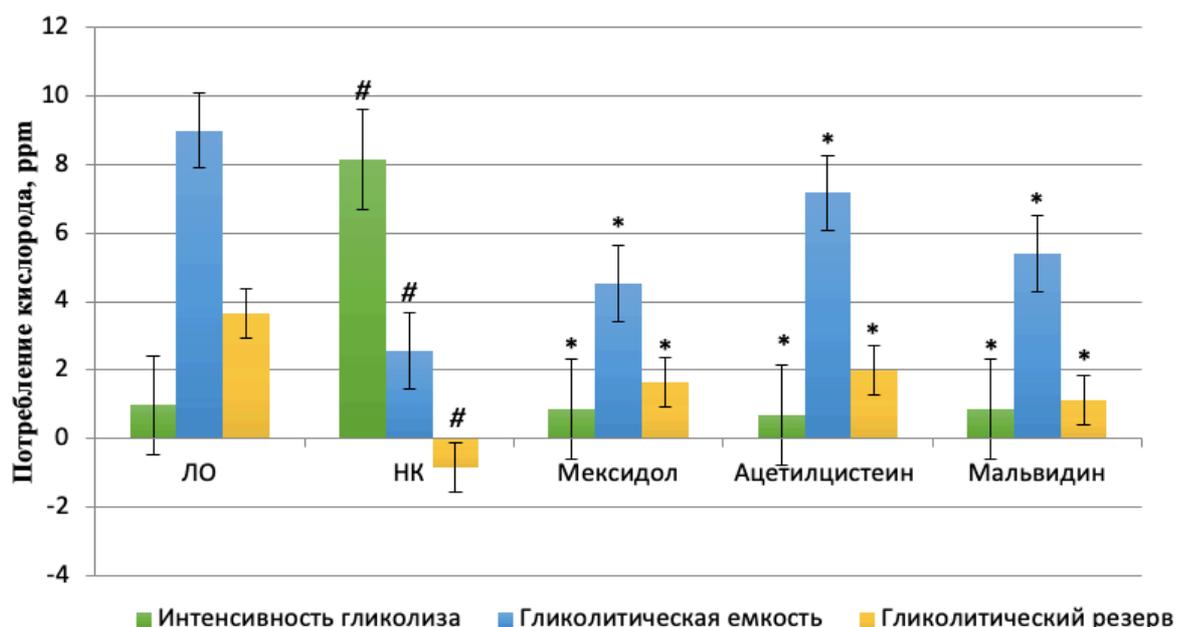


Рисунок 16 – Изменение процессов гликолиза на фоне введения препаратов сравнения и соединения-лидера в условиях церебральной ишемии

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

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

5.3.3. Изменение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи под влиянием препаратов сравнения и соединения-лидера в условиях церебральной ишемии

В условиях экспериментальной ишемии головного мозга у крыс наблюдалось снижение активности комплексов митохондриальных цепей I, II, IV и V. У группы крыс НК относительно группы ЛО животных отмечено снижение активности комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий I, II, IV и V в 4,84 раза ($p < 0,05$), 4,6 раза ($p < 0,05$), 13,4 раза ($p < 0,05$) и 9,33 раза ($p < 0,05$), соответственно (Рисунок 17).

На фоне введения крысам мексидола было отмечено увеличение активности комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий относительно группы крыс НК: комплекс I- в 1,65 раза ($p < 0,05$), комплекс II

– в 1,65 раза ($p < 0,05$), комплекс IV – в 4,6 раза ($p < 0,05$) и комплекс V – в 6,7 раза ($p < 0,05$), соответственно.

Активность комплексов I, II, IV и V митохондриальных цепей у крыс, получавших ацетилцистеин была выше относительно группы НК в 4,15 раза ($p < 0,05$), в 2,11 раза ($p < 0,05$), в 5,84 раза ($p < 0,05$) и 9,66 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Мальвидин приводил к повышению активности комплексов митохондриальных цепей I, II, IV и V в 4,78 раза ($p < 0,05$), 3,62 раза ($p < 0,05$), 20,96 раза ($p < 0,05$) и 10,31 раза ($p < 0,05$), в сравнении с группой НК, соответственно. Мальвидин превзошел препараты сравнения по действию на I и IV митохондриальные комплексы. Мальвидин способствовал усилению активности I митохондриального комплекса в 2,9 раза ($p < 0,05$) и IV митохондриального комплекса в 10 раз ($p < 0,05$), чем мексидол. Относительно ацетилцистеина, введение мальвидина вызывало повышение активности IV митохондриального комплекса (в 3,6 раза ($p < 0,05$)) (Рисунок 17).

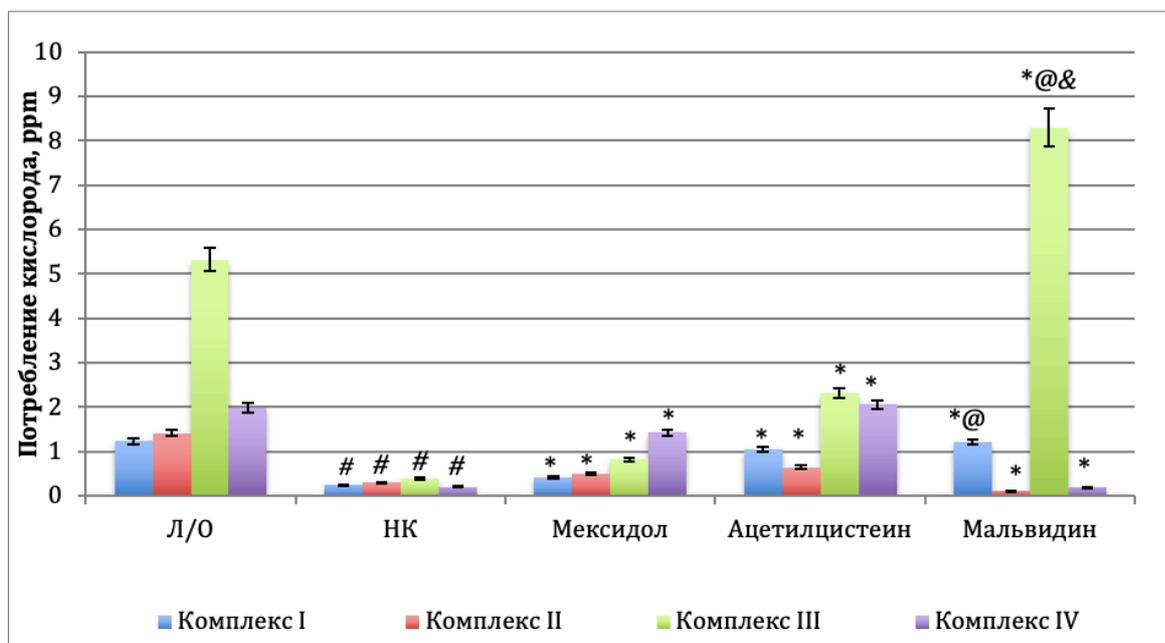


Рисунок 17 – Изменение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи под влиянием препаратов сравнения и соединения-лидера в условиях церебральной ишемии

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

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

@ - статистически значимо относительно группы животных, получавшей мексидол (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).

5.3.4. Влияние мальвидина на активность митохондриальной поры

Моделирование ишемии головного мозга животным привело к уменьшению латентного времени открытия митохондриальной поры. Так, у крыс группы НК латентное время открытия mPTP на 46,3% ($p < 0,05$) уменьшилось в сравнении с группой ЛО. У животных, которым вводили мексидол и ацетилцистеин, наблюдалось увеличение времени открытия mPTP на 49% ($p < 0,05$) и на 54,34% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. Мальвидин также способствовал увеличению латентного времени открытия mPTP на 44,3% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК (Рисунок 18).

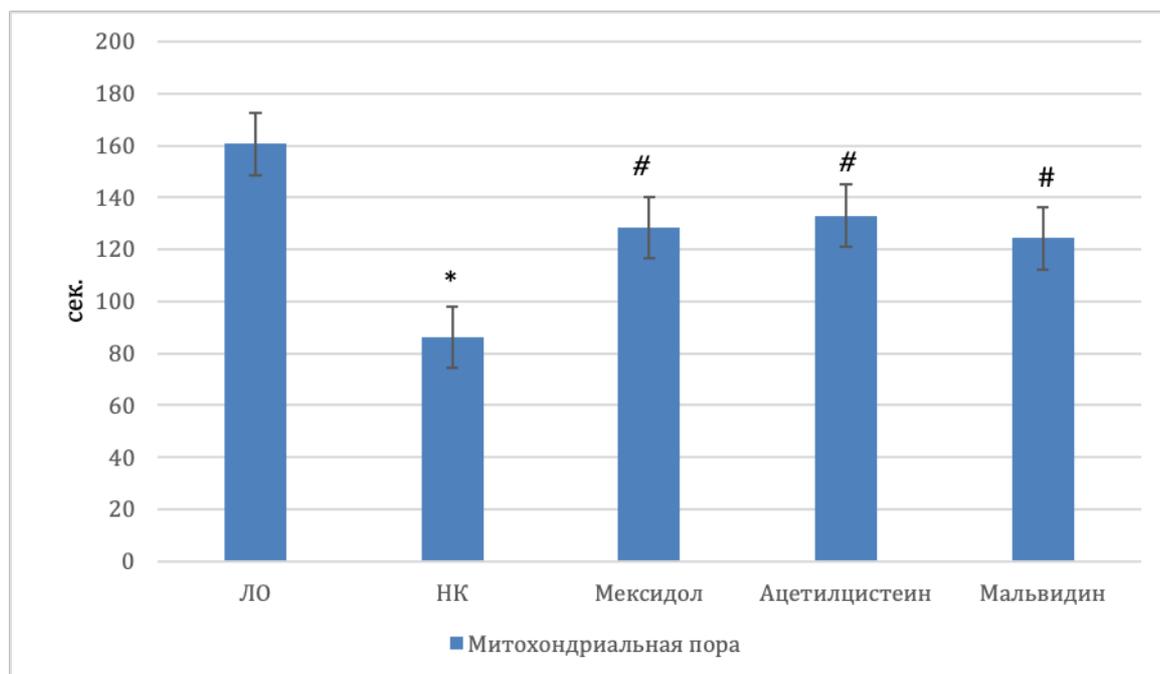


Рисунок 18 – Изменение латентного времени открытия митохондриальной поры при введении мальвицина и препаратов сравнения в условиях церебральной ишемии

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

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

5.3.5. Исследование влияния мальвицина на концентрацию кальция в головном мозге

Содержание ионов кальция у группы крыс НК относительно группы ЛО возросло в 457,7% ($p < 0,05$) раза. Введение мексидола животным способствовало уменьшению концентрации кальция на 44,83% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК, тогда как введение ацетилцистеина снижало данный показатель на 40,2% ($p < 0,05$) (Рисунок19). У группы животных, которые получали в качестве фармакологической поддержки мальвицин, содержание кальция в гомогенате головного мозга было ниже на 45,97% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. У крыс, которым вводили мальвицин, содержание кальция на 9,6% ($p < 0,05$) оказалось ниже, чем у группы крыс, которая получала ацетилцистеин.

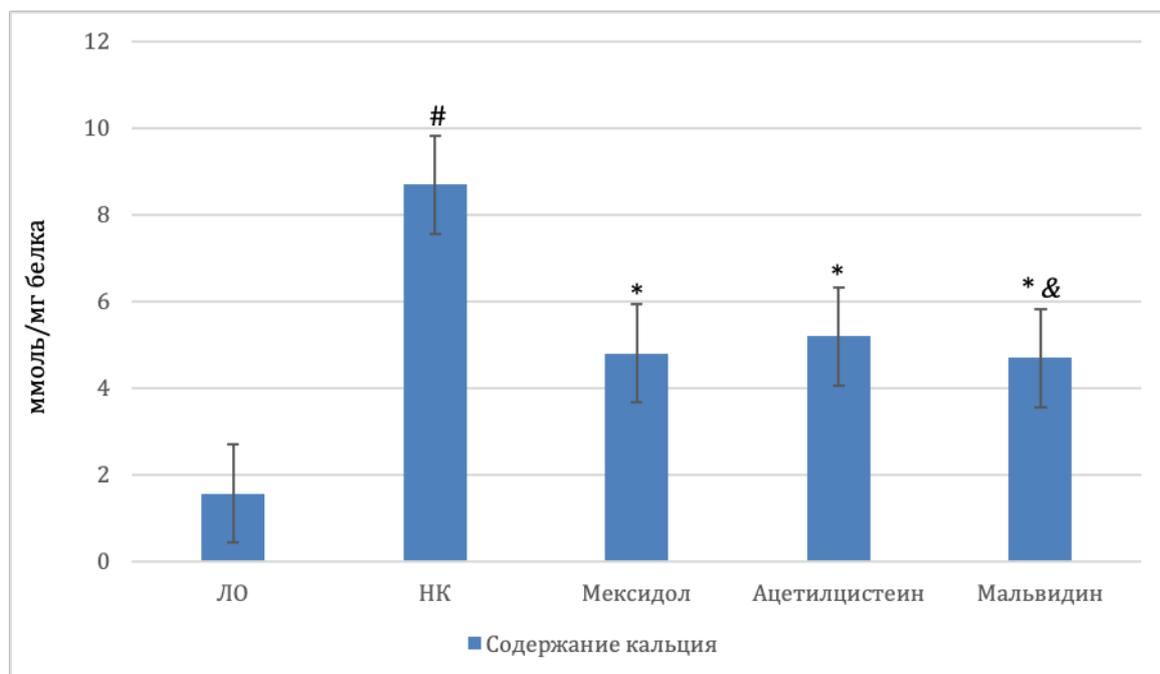


Рисунок 19 – Изменение содержания кальция на фоне введения мальвидина в условиях фокальной ишемии

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

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

& - статистически значимо относительно группы животных, получавшей ацетилцистеин (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).

5.3.6. Влияние мальвидина и препаратов сравнения на митохондриальный мембранный потенциал в условиях фокальной ишемии головного мозга

У крыс с ишемическим повреждением головного мозга митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi$) снизился на 54,59% ($p < 0,05$) относительно группы ЛО крыс. Мексидола способствовал увеличению $\Delta\Psi$ на 50,75% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК, введение ацетилцистеина повышало $\Delta\Psi$ на 57,01% ($p < 0,05$) относительно группы НК (Рисунок 20).

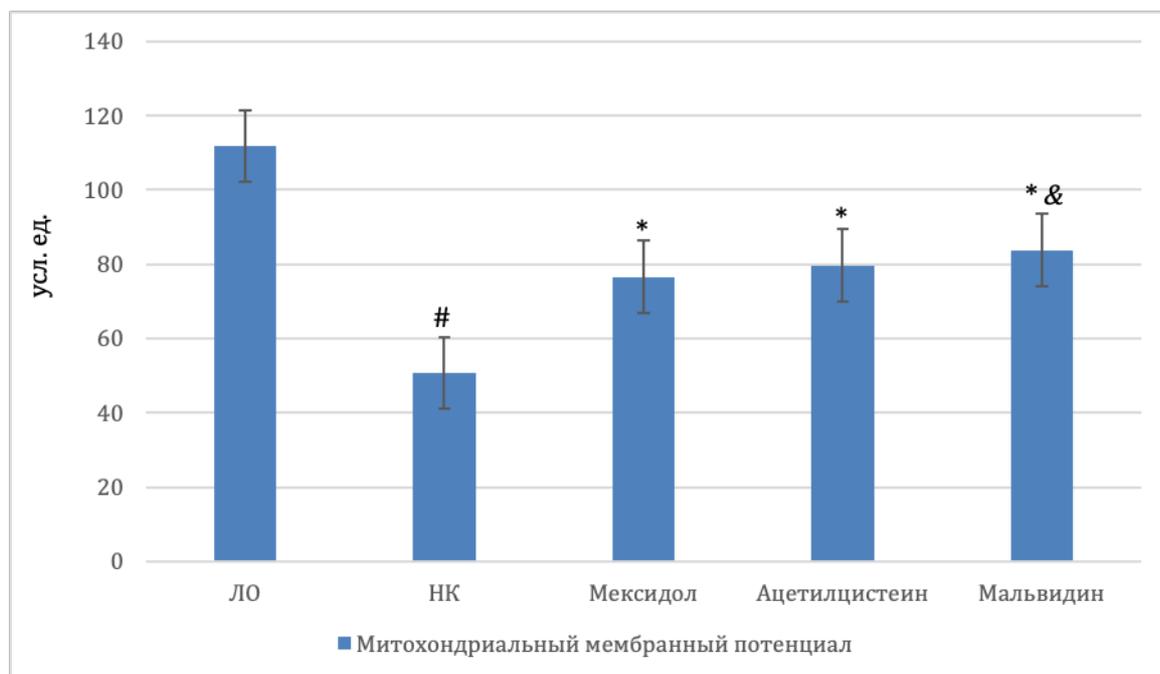


Рисунок 20 – Изменение активности митохондриального мембранного потенциала при введении мальвидина в условиях церебральной ишемии

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

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

& - статистически значимо относительно группы животных, получавшей мексидол (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$).

Митохондриальный мембранный потенциал у группы крыс, которая получала мальвидин, данный показатель повысился на 65,02% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК (Рисунок 20). Введение мальвидина крысам способствовало увеличению митохондриального мембранного потенциала на 9,5%, чем введение мексидола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенных экспериментов можно сделать вывод, что изучаемое соединение мальвидин обладает церебропротекторной активностью. Стоит отметить, что аспектами механизма действия мальвидина выступают эндотелиопротекторное, антиоксидантное, метаболическое, противовоспалительное действия, а также положительное влияние соединения на митохондриальную функцию в условиях ишемии головного мозга. Опираясь на особенности патогенеза ишемического инсульта и химическую структуру соединения-лидера, можно говорить, что мальвидин обладает многотаргетным церебропротекторным механизмом действия, что соответствует требованию комплексной терапии цереброваскулярных заболеваний.

В условиях фокальной ишемии головного мозга мальвидин уменьшал зону некроза ишемизированной ткани, снижал отек мозга, а также улучшал энергообменные процессы мозга, снижая концентрацию лактата, пирувата и гомоцистеина. Коррекция митохондриальной дисфункции мальвидином в условиях фокальной церебральной ишемии выражается в усилении респирометрической функции (повышение АТФ-генерирующей способности в 35,8 раза ($p < 0,05$)), максимального уровня дыхания в 23,38 раза ($p < 0,05$), респирометрической емкости в 24,45 раза ($p < 0,05$)), усилении активности митохондриальных комплексов (I – в 4,15 раза ($p < 0,05$), II – в 2,11 раза ($p < 0,05$), IV – в 5,84 раза ($p < 0,05$) и V – в 9,66 раза ($p < 0,05$)); стабилизации процессов гликолиза (снижение интенсивности гликолиза в 9,4 раза ($p < 0,05$)). Кроме того, мальвидин снижал концентрацию кальция в гомогенате мозга на 45,97% ($p < 0,05$), повышал латентное время открытия митохондриальной поры на 44,33% ($p < 0,05$) и митохондриальный потенциал на 65,02% ($p < 0,05$).

Улучшение функционального состояния эндотелия сосудов головного мозга крыс на фоне применения мальвидина, возможно, связано с его антиоксидантными, а также противовоспалительными свойствами полифенольных соединений (антоцианы) [225]. Подавление выделения чрезмерного количества оксидантов при введении крысам мальвидина, скорее всего вызывает уменьшение образования пероксинитрита, что способствует улучшению вазодилатирующей функции эндотелия сосудов.

Результаты эксперимента позволяют утверждать, что мальвидин обладает антиоксидантной активностью, что выражается в его способности улучшать эндогенную ферментативную антиоксидантную активность посредством увеличения активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы. В сравнении с референтными препаратами мальвидин превзошел мексидол и ацетилцистеин по влиянию на активность СОД на 32,05% ($p < 0,05$) и 61,76% ($p < 0,05$), соответственно. Кроме того, результаты проведенного эксперимента позволяют утверждать, что мальвидин обладает противовоспалительной активностью, что выражается в достоверном снижении провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6 в условиях фокальной церебральной ишемии. Теоретический анализ литературных источников показывает, что антиоксидантная активность мальвидина связана с ингибированием сигнальных путей MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа) и через сигнальный путь AMPK / SIRT1 [226].

Церебропротективные свойства мальвидина можно связать с их положительным действием на митохондрии, что находит подтверждение в гипотезе о митохондриях, как о перспективной мишени для средств, обладающих церебропротективным эффектом. Значительное количество свободных радикалов образуются в митохондриях, отсюда понятно, почему усиление активности антиоксидантных систем мальвидина сопряжено с улучшением функционального состояния митохондрий в условиях ишемии. Очевидно, что все эффекты мальвидина объединены в многокомпонентный

пул, выступающий против гетерогенного патогенеза ишемического инсульта.

ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ишемический инсульт – неврологическое расстройство, связанное с цереброваскулярным стенозом или окклюзией сосудов. Это вторая по значимости причина смерти и первая по значимости причина длительной инвалидности среди взрослых во всем мире [228]. Кроме того, частота ишемического инсульта растет с каждым годом. Ишемия приводит к образованию необратимо поврежденного очага, так называемого «ядра» инфаркта и окружающей жизнеспособной полутени (пенумбры) в ишемическом полушарии, на которую направлена фармакотерапия. Клинически золотым стандартом лечения ишемического инсульта является ранняя реканализация окклюзированных мозговых артерий внутривенным тромболизом или механической тромбэктомией для уменьшения инфарктов при спасении зоны пенумбры. Но, к сожалению, из-за узкого временного интервала внутривенного тромболиза (в течение 3–4,5 часов с начала) и отсутствия адекватной стандартизации методов механической тромбэктомии, клиническое лечение ишемического инсульта имеет много ограничений и нуждается в дальнейшем развитии [229-230].

Соответственно, поиск новых эффективных и безопасных церебропротекторных лекарственных средств – важная задача для всего здравоохранения. Анализ многочисленных литературных источников [135-171] позволил сделать вывод, что эффективным и безопасным церебропротекторным действием могут обладать вещества растительного происхождения из группы производных коричной кислоты и флавоноидов, что послужило основанием для включения данного ряда соединений в настоящее исследование.

На первом этапе диссертационной работы был проведен фармакологический скрининг, включающий изучение 13 соединений

(гесперидин, диосмин, теафлавин, хризин, хризантемин, мальвидин, гиперозид, глицетин, куркумин, кофейная кислота, галловая кислота, сорбиновая кислота, коричная кислота). В ходе данного блока исследования оценивалось влияние экспериментальных веществ на выраженность зоны некроза, степени отека головного мозга, концентрации молочной, пировиноградной кислот и гомоцистеина в условиях церебральной фокальной ишемии. Кроме того, изучали ориентировочно-исследовательскую, двигательную и психо-эмоциональную активность животных в тестах приподнятый крестообразный лабиринт, открытое поле, тест экстраполяционного избавления и условный рефлекс пассивного избегания. Данные, полученные в ходе проведенного скрининга, позволили установить, что наиболее выраженным церебропротекторным эффектом из всех исследуемых объектов, превосходящим референтные препараты – мексидол и ацетилцистеин, обладает соединение мальвидин.

Так, применение мальвидина способствовало уменьшению зоны некроза на 55,11% ($p < 0,05$) и уменьшению гидратации ткани головного мозга крыс – на 10,83% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс НК. Мальвидин превзошел препараты сравнения – мексидол и ацетилцистеин – по влиянию на выраженность зоны некроза мозговой ткани (на 15,23% ($p < 0,05$) и 12,9% ($p < 0,05$)). Также мальвидин достоверно понижал концентрацию лактата на 28,1% ($p < 0,05$), пирувата на 46,86% ($p < 0,05$) и гомоцистеина на 32,26% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК. По отношению к группе, получавшей мексидол, у крыс, получавших мальвидин, концентрация пирувата в сыворотке крови крыс была ниже на 8,8% ($p < 0,05$), а лактата на 16,34% ($p < 0,05$). Кроме того, мальвидин улучшал двигательную активность, психо-эмоциональный статус, восстановление памятного следа животных в тестах ПКЛ, Открытое поле, ТЭИ, УРПИ.

Исследование зависимости «доза-эффект» для мальвидина позволила установить «параболический» характер действия соединения. В процессе проведения данного этапа исследования выявлено, что в диапазоне доз 25

мг/кг, 50 мг/кг и 100 мг/кг, 150 мг/кг, 250 мг/кг, соединение-лидер обладало наиболее выраженным эффектом в дозе 100 мг/кг, что проявлялось в уменьшении зоны некроза и степени отека головного мозга, а также концентрации лактата, пирувата и гомоцистеина в условиях церебральной ишемии.

Кроме того, следует отметить, что влияние соединения-лидера на исследуемые показатели превосходило таковое у препаратов сравнения. Параболический характер зависимости «доза-эффект» для соединения мальвидина, вероятно, может быть связан со спецификой химического строения исследуемого вещества. Известно, что при введении высоких доз флавоноидов, их антиоксидантное действие может сменяться прооксидантным, что, соответственно, угнетает антиоксидантное терапевтическое действие применяемых веществ [231].

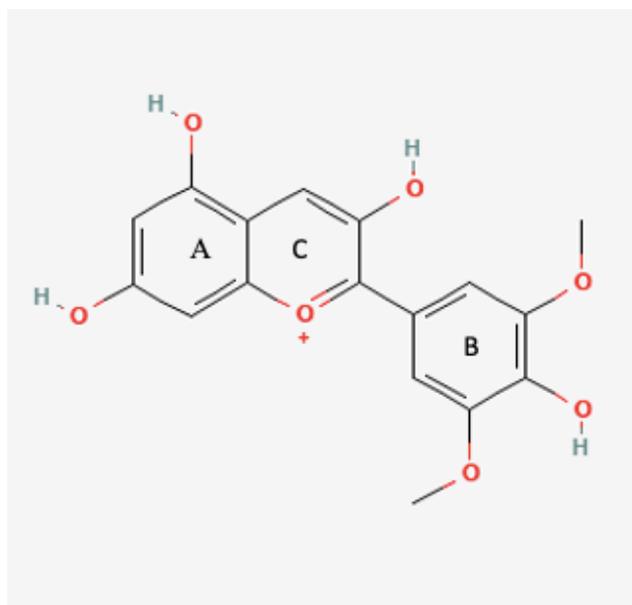


Рисунок 21 – Особенности структуры мальвидина

Мальвидин относится к группе антоцианов, эффекты которых активно изучаются в настоящее время. Структура мальвидина содержит гидроксильную группу в кольцах А, В, С, а также двойную связь в кольце С,

что является «классическим» обоснованием антиоксидантного действия данного соединения [232].

Гидроксильные группы в химической структуре мальвидина усиливают восстановительные свойства вещества, являясь центром связывания радикалов. Несмотря на то, что гидроксильные группы, связанные с кольцом В считаются основными элементами скавенирования реактивных форм кислорода (РФК), ОН-группы кольца А только усиливают антиоксидантные свойства соединения [233].

Оценка антиоксидантной активности соединения-лидера показала, что мальвидин способен усиливать эндогенную ферментную антиоксидантную систему посредством увеличения активности СОД на 217% ($p < 0,05$), ГП на 104,56% ($p < 0,05$), каталазы на 216,5% ($p < 0,05$). Стоит отметить, что мальвидин эффективнее референтных препаратов усиливал активность СОД.

Окислительный стресс участвует в патофизиологии ишемического инсульта, нарушая при этом функцию сосудистого эндотелия и митохондриальную функцию [15, 16]. Ранее было доказано, что антоцианы обладают более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с другими флавоноидами. Их способность ограничивать окислительный стресс широко изучалась *in vitro* и *in vivo*, в результате чего было доказано, что антиоксидантные свойства антоцианов способствуют улучшению эндотелиальной функции [156-159, 169, 232].

Актуальным объяснением антиоксидантного действия антоцианов может служить активация пути ядерного фактора Nrf2, регулирующего экспрессию антиоксидантных белков, способных защищать от повреждения и воспаления [232].

Цереброваскулярные патологии характеризуются дисфункцией сосудистого эндотелия, что проявляется в нарушении вазодилатирующей функции и снижении антиагрегационного потенциала сосудистой стенки. В связи с вышесказанным изучалось влияние мальвидина на показатели

функционального состояния эндотелия сосудов в условиях фокальной ишемии головного мозга: вазодилатирующую и антиагрегационную активность. Мальвидин превзошел мексидол по своему антиагрегационному эффекту – степень агрегации тромбоцитов была ниже в 2,9 раза ($p < 0,05$) и скорость агрегации тромбоцитов в 2,2 раза ($p < 0,05$). Введение мальвидина крысам способствовало восстановлению вазодилатирующей функции эндотелия, что подтверждается адекватными ответами на введение эндотелийспецифичных анализаторов (АЦХ, L-NAME, L-аргинин). Современные исследования установили, что антоцианы активируют эндотелиальную NO-синтазу и улучшают функцию эндотелия [233].

Эндотелиотропные эффекты антоцианов связывают со многими механизмами, в числе которых активация пути ядерного фактора – Nrf2, который регулирует eNOS и, соответственно, продукцию NO в эндотелиальных клетках [234].

Кроме того, антиоксидантные свойства мальвидина могут вызывать уменьшение образования пероксинитрита, что ведет к нормализации активности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), отвечающей за вазодилатацию сосудов [225].

В исследовании Johnson S.A. и др. говорится, что ежедневное потребление черники (*Vaccinium virgatum* и *Vaccinium corymbosum*), которая содержит мальвидин, вызывает снижение артериального давления, что ученые связывают с увеличением продукции NO [235].

Результаты экспериментальной работы показали, что в условиях фокальной ишемии головного мозга, мальвидин снижает концентрацию молочной кислоты и пирувата, что является важным показателем коррекции метаболических нарушений. Лактатацидоз, развивающийся во время дефицита кислорода формируется при гиперпродукции молочной кислоты в ишемизированных тканях, как промежуточного продукта анаэробного образования АТФ. Так, введение мальвидина в дозе 100 мг/кг крысам

вызывало понижение концентрации лактата на 28,1% ($p < 0,05$) и пирувата на 46,86% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс, не получавшей фармакологической поддержки. Молочная и пировиноградная кислоты в условиях митохондриальной дисфункции обуславливают внутриклеточный ацидоз, который в свою очередь ведет к блокаде переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий, уменьшая устойчивость мембран митохондрий к литическому действию фосфолипаз и протеаз, способствуя «утечке» электронов и образованию АФК [66, 88].

Другим метаболическим нарушением, развивающимся при ишемическом инсульте является гипергомоцистеинемия. Известно, что гомоцистеин – маркер первичной митохондриальной дисфункции, что важно для диагностики данного состояния. Гомоцистеин может усугублять течение цереброваскулярных патологий, что обусловлено его повреждающим действием на эндотелий кровеносных сосудов и активацией системы свертывания [236]. Данные исследовательской работы показали, что у крыс, получавших мальвидин, было отмечено понижение концентрации гомоцистеина на 32,26% ($p < 0,05$) относительно НК группы животных. Известно, что соединения, направленные на улучшение митохондриальной функции, могут улучшать состояние эндотелия, защищая митохондрии в эндотелиальных клетках через сигнальный путь Nrf2-MafF/ARE, который ингибирует эндотелиальный апоптоз клеток в условиях гипоксии и воспаления [237].

Дальнейшее исследование мальвидина было посвящено оценке митохондриальной функции в условиях церебральной ишемии на фоне применения соединения. Результаты выполненного исследования показали, что мальвидин усиливает активность ферментов электрон-транспортной цепи митохондрий, включая НАДН-дегидрогеназный, сукцинатдегидрогеназный, убихинол-цитохром с-оксидоредуктазный и цитохром с-оксидазный комплексы, восстанавливая протонный градиент на внутренней мембране митохондрий в условиях ишемии [238]. При введении

крысам мальвидина наблюдалось повышение активности комплексов митохондриальных цепей: НАДН-дегидрогеназный в 4,78 раза ($p < 0,05$), сукцинатдегидрогеназный в 3,62 раза ($p < 0,05$), убихинол-цитохром с-оксидоредуктазный в 20,96 раза ($p < 0,05$) и цитохром с-оксидазный в 10,31 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК. Следует отметить, что мальвидин превзошел референтные препараты по влиянию на активность НАДН-дегидрогеназный и цитохром с-оксидазный комплексы.

Окислительный стресс является одним из основных механизмов при ишемическом инсульте, который частично вызван митохондриальной дисфункцией и, в свою очередь, способствует дальнейшему повреждению митохондрий нейронов [239]. Таким образом, мальвидин может выступать в качестве регулятора в работе митохондриальной системы переноса электронов для предотвращения чрезмерного высвобождения свободных радикалов и, тем самым, уменьшения вызванного окислительным стрессом повреждения митохондрий при ишемическом инсульте. В соответствии с этой гипотезой исследование показало, что мальвидин может снизить окислительный стресс, вызванный дисфункциональными митохондриями поврежденных нейронов, усиливая активность антиоксидантных ферментов – СОД, глутатионпероксидазы и каталазы [240].

Дополнительно оценивали митохондриальный потенциал в условиях фокальной ишемии головного мозга. Митохондриальная пора отвечает за регуляторную и метаболическую функции клетки не только в физиологических условиях, но и в разных патологических состояниях. Воздействие на митохондриальную пору считается перспективным направлением для поиска церебропротекторных средств, способных улучшать метаболические и функциональные процессы нейронов [241, 242]. При ишемическом инсульте наблюдается деполяризация митохондриальной мембраны, что приводит к истощению АТФ и апоптозу или некрозу [243]. Результаты нашей работы показали, что мальвидин может повышать

митохондриальный потенциал и, тем самым, улучшить выработку АТФ [244-248].

Митохондриальный мембранный потенциал у группы крыс, которая получала мальвидин, увеличился на 65,02% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК. Мальвидин по влиянию на митохондриальный потенциал превзошел мексидол. Соответственно, применение мальвидина может ослабить митохондриальную респираторную недостаточность, а также поддерживать количество здоровых нейронных митохондрий при церебральной фокальной ишемии.

Кроме того, мальвидин также увеличивает латентный период открытия mPTP во внутренней митохондриальной мембране, тем самым инактивируя высвобождение АИФ и цитохрома с из митохондрий в цитозоль [159, 160]. В диссертационной работе установлено, что мальвидин способствует увеличению латентного времени открытия mPTP на 44,3% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК. Следует отметить, что митохондриально-опосредованные апоптотические пути типичны для ишемического инсульта, возникающего, когда митохондрии не могут выполнять свои функции [248].

Таким образом, текущие данные показывают, что мальвидин улучшает респирометрическую функцию митохондрий, увеличивает активность митохондриальных комплексов дыхательной цепи, корректирует процессы гликолиза. Мальвидин также повышает митохондриальный мембранный потенциал и регулирует открытие митохондриальной поры, что играет важную роль для сохранения функционального состояния нейронов в условиях ишемического инсульта.

В последние годы, благодаря обширным исследованиям в области кальциевой сигнализации, достигнут прогресс в понимании кальциевого гомеостаза митохондрий [249]. Ключевым компонентом кальций - опосредованного клеточного ответа на внеклеточные стимулы является гомеостаз Ca^{2+} в митохондриях, контролирующего основные функции митохондрий [250]. Как известно, функции митохондрий тесно

взаимосвязаны с кальцием. Кальциевой гомеостаз в нейронах определяет продукцию АТФ, динамику митохондрий, реализацию механизмов участия в иммунном ответе и апоптозе. Дисфункциональное состояние ЭТЦ митохондрий приводит к нарушению баланса протонного градиента, что чревато избыточным накоплением кальция, которое не совместимо с жизнедеятельностью митохондрий, поэтому Ca^{2+} высвобождается через систему антипорта при значительном повышении в матриксе [251]. Однако, данный процесс невозможен при митохондриальной дисфункции, что создает неконтролируемый взаимосвязанный круг. Цитозольная перегрузка Ca^{2+} , и дисбаланс между митохондриальным поглощением и удалением Ca^{2+} могут привести к токсическому накоплению Ca^{2+} в митохондриях. Это часто приводит к открытию поры перехода митохондриальной проницаемости, что, в свою очередь, приводит к набуханию и дисфункции митохондрий и, наконец, к гибели клеток в результате апоптоза или некроза при некоторых нейродегенеративных заболеваниях [252], таких как ишемическое поражение головного мозга. В проведенном исследовании было установлено, что применение мальвидина, понижало содержание кальция в гомогенате головного мозга на 45,97% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. В сравнении с реферетным препаратом ацетилцистеином, мальвидин выраженнее снижал содержание кальция (на 9,6% ($p < 0,05$)). Митохондриальный Ca^{2+} действует как непрямой индуктор митохондриальных комплексов I, III и IV [254], а также активирует АТФ-синтазу [249]. Кроме того, известно, что митохондриальный Ca^{2+} ингибирует высвобождение АФК в физиологических условиях [252]. Последние исследования установили, что кальций-зависимая активация САМКII β (кальмодулин-зависимая протеинкиназа) связана с биогенезом митохондрий в нейронах. Этот белок способен активировать АМПК, который является одним из основных регуляторов ключевого фактора биогенеза митохондрий PGC1 α [252].

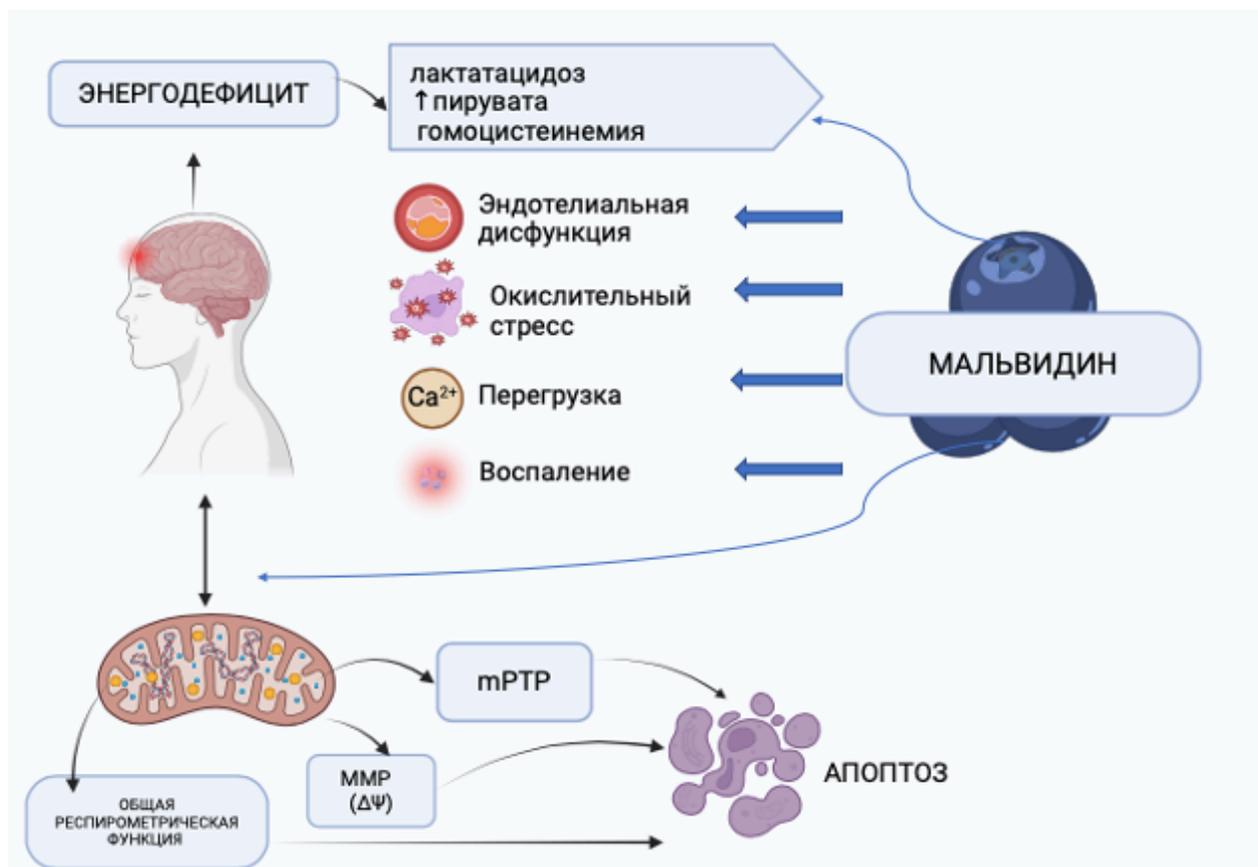


Рисунок 22 – Потенциальный механизм действия мальвидина

Примечание: Рисунок создан в программе «Biorender» (biorender.com).

Термин «митохондриальная дисфункция» относится к любому нарушению митохондриального состояния, процессов биогенеза, морфологии, слияния/деления, работы ЭТЦ, митохондриального потенциала и митохондриальной поры, которые влияют на нормальную митохондриальную функциональность [251]. Клетки обладают разными путями регуляции, которые ограничивают повреждение митохондрий и обеспечивают целостность клетки [252]. ЦНС очень восприимчива к нарушению функций митохондрий, о чем свидетельствуют данные о митохондриях в условиях нейродегенеративных патологий [253]. Повреждение митохондрий может способствовать окислительному стрессу, что проявляется дисбалансом между образованием и элиминацией АФК [252, 253]. Сохранение адекватной работы митохондрий позволит избежать процессы клеточной гибели, нивелировать нарушения, наблюдаемые при

ишемическом инсульте. Исходя из всего вышеописанного, следует заключить, что митохондрии являются связующим звеном многих звеньев ишемического каскада. Вторичная митохондриальная дисфункция может рассматриваться как новая перспективная мишень для поиска новых соединений и изучения существующих веществ, используемых для фармакотерапии цереброваскулярных патологий различного генеза. Полинаправленный механизм действия мальвидина, включающий восстановление эндотелиальной функции, антиоксидантное действие, коррекцию дисфункции митохондрий, улучшение когнитивных и мнестических функций, соответствует требованиям комплексной терапии ишемических состояний, что является важным подходом к лечению цереброваскулярных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. В ходе скрининга в ряду производных коричной кислоты и флавоноидов (13 соединений) установлено, что наиболее выраженным церебропротекторным действием обладает мальвидин, что обусловлено улучшением психо-эмоционального статуса и поисково-двигательной активности крыс в условиях экспериментальной ишемии головного мозга. Кроме того, мальвидин способствовал уменьшению зоны некроза на 53,78% ($p < 0,05$) и отека на 10,83% ($p < 0,05$), а также снижению концентрации лактата на 28,1% ($p < 0,05$), пирувата на 46,86% ($p < 0,05$), гомоцистеина на 32,26% ($p < 0,05$). Мальвидин приводил к более выраженному уменьшению зоны некроза, чем введение мексидола на 15,23% ($p < 0,05$) и ацетилцистеина на 12,9% ($p < 0,05$).

2. Исследование доза-эффект мальвидина показало, что наиболее выраженное церебропротекторное действие соединение проявляет в дозе 100 мг/кг.

3. Мальвидин в дозе 100 мг/кг сохраняет вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов, о чем можно судить по реакции на эндотелийспецифические анализаторы. На фоне введения АЦХ и L-аргинина скорость кровотока возросла на 37,4% ($p < 0,05$) и на 20,34% ($p < 0,05$), L-NAME привел к снижению скорости кровотока на 31,1% ($p < 0,05$). Мальвидин восстанавливает антитромбогенный потенциал эндотелия сосудов, что отражено в снижении степени агрегации тромбоцитов и скорости агрегации тромбоцитов в 5,9 раза ($p < 0,05$) и 2,9 раза ($p < 0,05$) относительно группы НК.

4. Мальвидин увеличивает активность ферментов антиоксидантной системы: СОД на 217% ($p < 0,05$), ГП на 104,56% ($p < 0,05$) и каталазы на 216,45% ($p < 0,05$) по отношению к группе крыс НК. В сравнении с мексидолом, мальвидин повышал активность СОД на 32,05%

($p < 0,05$) выраженнее. Относительно ацетилцистеина данный показатель был повышен на 61,76% ($p < 0,05$).

5. Мальвидин на фоне фокальной ишемии головного мозга приводит к снижению уровня ФНО- α на 44% ($p < 0,05$) и ИЛ-6 на 25% ($p < 0,05$) в сравнении с группой НК.

6. Применение мальвидина в условиях церебральной фокальной ишемии привело к улучшению митохондриальной функции, на что указывает восстановление респирометрической функции (усиление АТФ-генерирующей способности в 35,83 раза ($p < 0,05$), максимального уровня дыхания в 23,38 раза ($p < 0,05$) и респирометрической ёмкости на 23,49% ($p < 0,05$)). На фоне введения мальвидина наблюдалось увеличение АТФ-генерирующей способности митохондрий в 3,72 раза ($p < 0,05$) и повышение максимального уровня дыхания в 3,91 раза ($p < 0,05$), тогда как респирометрическая ёмкость усиливалась в 4,13 раза ($p < 0,05$) относительно группы крыс, получавших мексидол. Мальвидин привел к более выраженному возрастанию активности I митохондриального комплекса в 2,9 раза ($p < 0,05$) и IV митохондриального комплекса в 10 раз ($p < 0,05$), чем введение мексидола. Относительно ацетилцистеина, мальвидин вызывал повышение активности IV митохондриального комплекса в 3,6 раза выраженнее ($p < 0,05$).

7. Мальвидин снижал концентрацию кальция в гомогенате головного мозга на 45,97% ($p < 0,05$), повышал латентное время открытия митохондриальной поры на 44,3% ($p < 0,05$) и митохондриальный потенциал на 65,02% ($p < 0,05$). Мальвидин способствовал более выраженному увеличению митохондриального потенциала на 9,5%, чем введение мексидола. У крыс, которым вводили мальвидин содержание кальция на 9,6% ($p < 0,05$) оказалось ниже, чем у группы крыс, получавшей ацетилцистеин.

8. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о целесообразности дальнейшего углубленного изучения

церебропротекторных свойств мальвидина с целью создания на его основе средства для терапии и/или профилактики ишемического инсульта.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Перспективной стратегией является дальнейшее изучение мальвидина с целью создания на его основе церебропротекторного средства для терапии и/или профилактики ишемических поражений головного мозга.

2. Данные диссертационного исследования позволяют рекомендовать химикам-синтетикам целенаправленный поиск и синтез новых биологически активных соединений из класса антоцианов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ЦВЗ – цереброваскулярные заболевания
- МК – мозговой кровоток
- ЛО – ложнооперированные животные
- НК – группа крыс негативного контроля
- L – NAME - нитро-L—аргинин метиловый эфир
- NOS – синтаза оксида азота
- eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота
- iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота
- nNOS – нейрональная синтаза оксида азота
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ИЛ – интерлейкин
- ФНО- α – фактор некроза опухоли α
- АДФ – аденозиндифосфат
- АТФ - аденозинтрифосфат
- АОЗ- антиоксидантная защита
- АФК – активные формы кислорода
- АИФ– апоптоз-индуцирующий фактор
- JNK – c-Jun-концевая киназа
- ROS – reactive oxygen species (реактивные формы кислорода)
- ОП – тест «Открытое поле»
- ПКЛ – тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»
- УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания
- ТЭИ – тест «экстраполяционного избавления»
- ИФА – иммуноферментный анализ
- СОД – супероксиддисмутаза
- ГП – глутатионпероксидаза

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

PINK1 – (PTEN-индуцированная предполагаемая киназа 1)

НТХ – n-нитротетразолия хлорида

ТМЭДА – тетраметилэтилендиамин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭГТА – этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N,N-тетрауксусная кислота

TMPD – N, N ,N',N'-тетраметил-1,4-фенилендиамин

mPTP – permeability transition pore, митохондриальная переходная пора проницаемости

NO – оксид азота

O₂⁻ – супероксид анион

Δψ_m – митохондриальный мембранный потенциала

tPA – тканевой активатор плазминогена

PTK2B – протеинтирозинкиназа 2

TLR – толл-подобные рецепторы

ЭТЦ – электронно-транспортная цепь

АМФК – активируемая протеинкиназа

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа

САМКIIβ – кальмодулин-зависимая протеинкиназа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment / H. P. Adams Jr [et al.] // *Stroke*. – 1993. – Vol. 24. – №. 1. – P. 35-41.
2. Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 / C.O. Johnson [et al.] // *The Lancet Neurology*. – 2019. – Vol. 18. – №. 5. – P. 439-458.
3. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association: published correction appears in *Circulation* / S.W. Tsao [et al.] // *Circulation*. – 2022. – Vol.145. – №8. – P.e153-e639.
4. TRPM2 in ischemic stroke: Structure, molecular mechanisms, and drug intervention / Q. Wang [et al.] // *Channels (Austin)*. – 2021. – Vol.15. – №1. – P.136-154.
5. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
6. Global and regional burden of first-ever ischemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 / R.V. Krishnamurthi [et al.] // *The Lancet Global Health*. – 2013. – Vol. 1. – №. 5. – P. 259-281.
7. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches / C.D. Maida [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21. - №18. – P.6454.
8. Bogousslavsky, J., The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke / J. Bogousslavsky, G. Van Melle, F. Regli // *Stroke*. – 1988. – Vol. 19. – №. 9. – P. 1083-1092.

9. Intracranial Atherosclerosis Assessed with 7-T MRI: Evaluation of Patients with Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack / A. Lindenholtz [et al.] // *Radiology*. – 2020. – Vol.295. – №1. – P.162-170.
10. Пирадов, М.А. Инсульт: пошаговая инструкция / М.А. Пирадов, М.Ю. Максимова, М.М. Танащян // Москва, Издательская группа «ГЭОТАР – Медиа». – 2019. С. 9 -10.
11. Фахретдинов, В.В. Современные подходы к реабилитации пациентов, перенесших инсульт / В.В. Фахретдинов, Н.С. Брынза, А.А. Курмангулов // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. – 2019. Т.18. –№2. – С.182-189.
12. Хасанова, Д.Р. Комплексная реабилитация пациентов с постинсультными синдромами / Д.Р. Хасанова, Ю.В. Житкова, И.И. Табиев // *МС* // – 2016. – №8.
13. Суслина, З.А. Клинико-эпидемиологические исследования – перспективное направление изучения церебральной патологии / З.А. Суслина, Ю.Я. Варакин, Н.В. Верещагин // *Анналы неврологии*. – 2009. – №3. – С.4 -11.
14. Мартыничик, С.А. Медико-экономическая оценка и обоснование совершенствования организационных форм оказания стационарной помощи при мозговом инсульте / С.А. Мартыничик, О.В. Соколова // *Электронный научный журнал «Социальные аспекты здоровья населения»*. – 2013, – №2. – С.30.
15. Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy: Potential Targets of Mesenchymal Stem Cells-Based Therapies in Ischemic Stroke / J. He [et al.] // *Frontiers in neuroscience*. – 2021. – Vol.15. – P.641157.
16. Moskowitz, M.A., The science of stroke: mechanisms in search of treatments / M.A. Moskowitz, E.H. Lo, C. Iadecola // *Neuron*. – 2010. – Vol.67 – №2. – P.181-198.

17. Broughton, B.R. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia / B.R. Broughton, D.C. Reutens, C.G. Sobey // *Stroke*. – 2009. – Vol.40. – P. 331–339.
18. Whelan, R.S. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance / R.S. Whelan, V. Kaplinskiy, R.N. Kitsis // *Annual review of physiology*. – 2010. – Vol.72. – P.19–44.
19. Sanada, S. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures / S. Sanada, I. Komuro, M. Kitakaze // *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. – 2011. – Vol.301. №5. – P.1723–1741.
20. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events / A.J. Marti-Carvajal, I. Sola, D. Lathyris, M. Dayer // *The Cochrane database of systematic reviews*. – 2017. – Vol.8. – P.CD006612.
21. Smith, A.D. Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention / A.D. Smith, H. Refsum // *Journal of Internal Medicine*. – 2021. – Vol.290. №4– P. 826-854.
22. Khoshnam, S.E. The interplay of MicroRNAs in the inflammatory mechanisms following ischemic stroke / S.E. Khoshnam, W. Winlow, M. Farzaneh // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 2017. – Vol.76. – №7. – P.548-561.
23. Anti-inflammatory signaling: the point of convergence for medical gases in neuroprotection against ischemic stroke / X. Li [et all.] // *Medical gas research*. – 2016. – Vol.6. №4. – P.227.
24. Protein misfolding, aggregation, and autophagy after brain ischemia / T. Luo [et all.] // *Translational stroke research*. – 2013. – Vol.4. – №6. – P.581-588.
25. Effects of early post-ischemic reperfusion and tPA on cerebrovascular function and nitrosative stress in female rats / H. Ahnstedt [et all.] // *Translational stroke research*. – 2016. – Vol.7. №3 – P.228-238.

26. Astrup, J. Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra / J. Astrup, B.K. Siesjö, L. Symon // *Stroke*. – 1981. – Vol.12. №6. – P.723-725.
27. Factors that determine penumbral tissue loss in acute ischemic stroke / S. Jung [et al.] // *Brain*. – 2013. – Vol.136. №12. – P.3554-3560.
28. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production / N. Li [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol.278. – №10.– P.8516-8525.
29. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia / S.D. Chen [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2011. – Vol.12. №10. – P.7199-7215.
30. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke / X. Jiang [et al.] // *Progress in neurobiology*. – 2018. – Vol.163–164 – P.144–171.
31. Immune responses in stroke: how the immune system contributes to damage and healing after stroke and how this knowledge could be translated to better cures? / A. Rayasam [et al.] // *Immunology*. – 2018. – Vol.154. – №3. – P.363–376.
32. Balistreri, C.R. Focus of endothelial glycocalyx dysfunction in ischemic stroke and Alzheimer's disease: Possible intervention strategies / C. R. Balistreri, L. Di Giorgi, R. Monastero // *Ageing research reviews*. – 2024. – Vol.99. – P. 721.
33. Endothelial Dysfunction and Pre-Existing Cognitive Disorders in Stroke Patients / A. M. Mendyk- Bordet [et al.] // *Biomolecules*. – 2024. – Vol.14. №16. – P.2216-2231.
34. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies / S. Xu [et al.] // *Pharmacological reviews*. – 2021. – Vol.73. – №3. – P. 924–967.

35. Furchgott, R.F. Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium- derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide / R.F. Furchgott // JAMA. – 1996. – Vol.276 – №14. – P.1186-1188.
36. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines / R. De Caterina [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 1995. – Vol.96. – №1. – P.60-68.
37. Janssen-Heininger, Y. M., Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB / Y.M. Janssen-Heininger, M.E. Poynter, P.A. Baeuerle // Free radical biology and medicine. – 2000. – 28. – №9. – P.1317–1327.
38. TNF α reduces eNOS activity in endothelial cells through serine 116 phosphorylation and Pin1 binding: Confirmation of a direct, inhibitory interaction of Pin1 with eNOS / S. Kennard [et al.] // Vascular Pharmacology. – 2016. – Vol.81. – P.61-68.
39. Liao, J.K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation / J.K. Liao // Journal of Clinical Investigation. – 2013.- Vol.123(2) – P.540-541.
40. Salvinatorin A moderates postischemic brain injury by preserving endothelial mitochondrial function via AMPK/Mfn2 activation / H. Dong [et al.] // Experimental Neurology. – 2019. – Vol.322. – P.113045.
41. Sirt1-Sirt3 axis regulates human blood-brain barrier permeability in response to ischemia / T. Chen [et al.] // Redox biology. – 2018. – Vol.14 – P.229–236.
42. Li, W. Targeting oxidative stress for the treatment of ischemic stroke: upstream and downstream therapeutic strategies / W. Li, S. Yang // Brain circulation. – 2016. – Vol.2. – №4. – P.153-163.
43. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches / C.D.

- Maida [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol.21. – №18. – P.6454.
44. Cronkite, D.A. The regulation of inflammation by innate and adaptive lymphocytes / D.A. Cronkite, T.M. Strutt // Journal of immunology research. – 2018. – P.1467538.
 45. Schimmel, S.J. Neuroinflammation in traumatic brain injury: a chronic response to an acute injury / S.J. Schimmel, S. Acosta, D. Lozano // Brain circulation. – 2017. – Vol.3. – №3. – P.135–142.
 46. Wang, Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion / Y. Wang, P. Ge, Y. Zhu // Mediators of inflammation. – 2013. – P. 124614.
 47. Kumar, V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation / V. Kumar // Journal of neuroimmunology. – 2019. – Vol.332. – P.16-30.
 48. Pro-inflammatory TNF α and IL-1 β differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells / S.J. O'Carroll [et al.] // Journal of neuroinflammation. – 2015. – Vol.12. – P.131.
 49. A cross-sectional study to assess the association between major depression and inflammatory markers in patients with acute ischemic stroke / H.H. Kozak [et al.] // Indian journal of psychiatry. – 2019.– Vol.61. – P.283-289.
 50. Reparative effects of interleukin-1 receptor antagonist in young and aged/co-morbid rodents after cerebral ischemia / J.M. Pradillo [et al.] // Brain, behavior, and immunity. – 2017. – Vol.61. – P.117-126.
 51. SCIL-stroke (subcutaneous interleukin-1 receptor antagonist in ischemic stroke): a randomized controlled phase 2 trial / C.J. Smith [et al.] // Stroke. – 2018. – Vol.49. – P.1210-1216.
 52. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage / M. Grilli [et al.] // The European journal of neuroscience. – 2000. – Vol.12. –№7. – P.2265–2272.
 53. BMP6 expression in the adult rat central nervous system / Hayashi Y. [et al.] // Journal of Chemical Neuroanatomy. – 2019. – Vol.98. – P.41-54.

54. Improves cerebral ischemia and reduces reperfusion injury in rats through TLR4/NF- κ B signaling pathway inhibition / X. Fan [et al.] // *Neurological research*. – 2020. – Vol.42. – №8. – P.693-702.
55. Григорьев, Е.В. Митохондриальная ДНК как кандидатный DAMP при критических состояниях / Е.В. Григорьев [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2019. – Т.18. – №3. – С.134-143.
56. The regulatory role of Toll-like receptors after ischemic stroke: neurosteroids as TLR modulators with the focus on TLR2/4 / S. Tajalli-Nezhad [et al.] // *Cellular and molecular life sciences*. – 2019. – Vol.76. – №3. – P.523–537.
57. Lee, C.H. Anti-inflammatory role of TAM family of receptor tyrosine kinases via modulating macrophage function / C.H. Lee, T. Chun // *Molecules, and cells*. – 2019. – Vol.42. – №1. – P.1–7.
58. Федин, А.И. Ишемический каскад в остром периоде инсульта и способы его коррекции / А.И. Федин, Е.А. Тютюмова, К.Р. Бадалян // *Фарматека*. 2017. – Т.9. – С.99-104.
59. Ischemic-hypoxic preconditioning enhances the mitochondrial function recovery of transplanted olfactory mucosa mesenchymal stem cells via miR-181a signaling in ischemic stroke / Y. Zhuo [et al.] // *Aging*. – 2021. – Vol.13. – №8. – P.11234-11256.
60. Tetrahydrocurcumin epigenetically mitigates mitochondrial dysfunction in brain vasculature during ischemic stroke / N.K. Mondal [et al.] // *Neurochemistry international*. – 2019. – Vol.122. – P.120–138.
61. Ginkgolide K attenuates neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting mitochondrial fission and GSK-3 β -dependent increases in mitochondrial membrane permeability / X. Zhou [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol.8. – P.44682–44693.
62. Different Roles of Mitochondria in Cell Death and Inflammation: Focusing on Mitochondrial Quality Control in Ischemic Stroke and Reperfusion / M. Carinci [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol.9. – №2. – P.169.

63. Mitophagy in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injury / L. Shen [et al.] // *Frontiers in aging neuroscience*. – 2021. – Vol.13 – P.687246.
64. Review of ginsenosides targeting mitochondrial function to treat multiple disorders: Current status and perspectives / Q. Huang, S. Gao, D. Zhao, X. Li // *Journal of ginseng research*. – 2021. – Vol.45 – №3. – P.371-379.
65. Mitochondrial dysfunction in neurological disorders: Exploring mitochondrial transplantation / P. Norat [et al.] // *NPJ Regenerative medicine*. – 2020. – Vol.5. – №1. – P.22.
66. Fernandez-Vizarra, E. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system / E. Fernandez-Vizarra, M. Zeviani // *FEBS Lett*. – 2021. – Vol.595. – №8. – P.1062-1106.
67. Anand, R. Emerging Roles of the MICOS Complex in Cristae Dynamics and Biogenesis / R. Anand, A.S. Reichert, A.K. Kondadi // *Biology (Basel)*. – 2021. – Vol.10. – №7. – P.600.
68. The Biochemical Assessment of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders / N. Turton [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol.23. №13. – P.7487.
69. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism / P. Mitchell // *Nature*. – 1961. – Vol.191. – P.144-148.
70. Magnetic resonance spectroscopy of the ischemic brain under lithium treatment. Link to mitochondrial disorders under stroke / D.N. Silachev [et al.] // *Chemico-biological interactions*. – 2015. – Vol.237. – P.175-182.
71. Rizack, M.A. An Epinephrine-Sensitive Lipolytic Activity in Adipose Tissue / M.A. Rizack // *The Journal of biological chemistry*. – 1964. – Vol.236. – P.657-662.
72. Kemp, B.E. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase / B.E. Kemp [et al.] // *Trends in biochemical sciences*. – 1999. – Vol.24. – P.22-25.

73. Gunter, T.E. Mechanisms by which mitochondria transport calcium / T.E. Gunter, D.R. Pfeiffer // *The American journal of physiology*. – 1990. – Vol.258. – P.755-786.
74. MiR-668 inhibitor attenuates mitochondrial membrane potential and protects against neuronal apoptosis in cerebral ischemic stroke / X. Zhang [et al.] // *Folia Neuropathol*. – 2020. – Vol.58. – № 1. – P.22-29.
75. Simultaneous Blood-Brain Barrier Crossing and Protection for Stroke Treatment Based on Edaravone-Loaded Ceria Nanoparticles / Q. Bao [et al.] // *ACS nano*. – 2018. – Vol.12. – №7. – P.6794–805.
76. Cellular Senescence, Mitochondrial Dysfunction, and Their Link to Cardiovascular Disease / M. Camacho-Encina [et al.] // *Cells*. – 2024. – Vol.13. – №4. – P.353.
77. Serum antioxidant enzymes activities and oxidative stress levels in patients with acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome / A. Milanlioglu [et al.] // *Wien Klin Wochenschr*. – 2016. – Vol.128. – №5-6. – P.169-174.
78. Cabral-Costa, J.V. Neurological disorders and mitochondria / J.V. Cabral-Costa, A.J. Kowaltowski // *Molecular aspects of medicine*. – 2020. – Vol.71. – P. 100826.
79. Gibson, C.J., BCL-2 antagonism to target the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis / C.J. Gibson, M.S. Davids // *Clin Cancer Res*. – 2015. Vol.21. №22. – P.5021–5029.
80. Silica nanoparticles induced intrinsic apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells via CytC/Apaf-1 pathway / Y. Yang [et al.] // *Environmental toxicology and pharmacology*. – 2017. – Vol.52. – P.161–169.
81. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection / L. Galluzzi, E. Morselli, O. Kepp, G. Kroemer // *Biochimica et biophysica acta*. – 2009. – Vol.1787. – №5. – P.402–13.
82. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis / E. Daugas [et al.] // *FASEB J*. – 2000. – Vol.14. – №5. – P.729–739.

83. Mitochondrial function and brain Metabolic Score (BMS) in ischemic Stroke: Evaluation of «neuroprotectants» safety and efficacy / A. Mayevsky [et al.] // *Mitochondrion*. – 2020. – Vol.50. – P.170-194.
84. Magnetic resonance spectroscopy of the ischemic brain under lithium treatment. Link to mitochondrial disorders under stroke / D.N. Silachev [et al.] // *Chemico-biological interactions*. – 2015. – Vol.237. – P.175-182.
85. Kemp, B.E. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase / B.E. Kemp [et al.] // *Trends in biochemical sciences*. – 1999. – Vol.24. – P.22-25.
86. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation / T.H. Sanderson [et al.] // *Mol Neurobiol*. – 2013. – Vol.47. – №1. – P.9-23.
87. Simultaneous Blood-Brain Barrier Crossing and Protection for Stroke Treatment Based on Edaravone-Loaded Ceria Nanoparticles / Q. Bao [et al.] // *ACS nano*. – 2018. – Vol.12. – №7. – P.6794–805.
88. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration / M. Verma [et al.] // *Translational neurodegeneration*. – 2022. – Vol.11. – №13. – P. 25.
89. Wages of fear: transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis / D.S. Izyumov [et al.] // *Biochimica et biophysica acta*, 1658. – 2004. – P.141-147.
90. Supralinear Dependence of the IP3 Receptor-to-Mitochondria Local Ca²⁺ Transfer on the Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Loading / G. Csordás [et al.] // *Contact (Thousand Oaks (Ventura County, Calif.))*. – 2024. – Vol.7. – P.25152564241229273.
91. Левченкова, О.С. Митохондриальная пора как мишень фармакологического воздействия / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. – 2014. – Т.13. – №4. – С.24-33.

92. Максимова, М.Ю. Ишемический инсульт и антитромботическая терапия: ключевые аспекты применения / М.Ю. Максимова, А.В. Фонякин, Л.А. Гераскина // Медицинский совет. – 2019. – №18. – С.10-17.
93. Targeted nano-delivery strategies for facilitating thrombolysis treatment in ischemic stroke / H. Ma [et al.] // Drug Delivery. – 2021. – Vol.2. – №1. – P.357-371.
94. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke / W. Hacke [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2008. – Vol.359. – №13. – P.1317-1329.
95. Neuroprotection during Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: A Review of Future Therapies / V. Dammavalam [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2024. – Vol.25. – №2. – P.891.
96. Baron, J.C. Nerinetide: A Potential Neuroprotectant as Adjunct to Thrombectomy for Acute Stroke / J.C. Baron // Canadian Journal of Neurological Sciences. – 2021. – Vol.48. – №1. – P.138.
97. SAFE-TPA Investigators. Safety and Efficacy of Otaplimastat in Patients with Acute Ischemic Stroke Requiring tPA (SAFE-TPA): A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study / J.S. Kim [et al.] // Annals of Neurology. – 2020. – Vol.87. – №2. – P.233-245.
98. Geraldini, F. A Comparison Between Enteral and Intravenous Nimodipine in Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Network Meta-Analysis / F. Geraldini [et al.] // Neurocritical care. – 2022. – Vol.36. – №3. – P.1071-1079.
99. Efficacy and safety of Cerebrolysin treatment in early recovery after acute ischemic stroke: a randomized, placebo-controlled, double-blinded, multicenter clinical trial / K. Gharagozli [et al.] // Journal of Medicine and Life. – 2017. – Vol.10. – №3. – P.153-160.

100. The neuroprotective mechanisms of ginkgolides and bilobalide in cerebral ischemic injury: a literature review / Z. Feng [et al.] // *Molecular Medicine*. – 2019. – Vol.25. – №1. – P.57.
101. «Insights into Recent Studies on Biotransformation and Pharmacological Activities of Ginsenoside Rd» / X. Song [et al.] // *Biomolecules*. – 2022. – Vol.12. – №4. – P.512.
102. Natalizumab in acute ischemic stroke (ACTION II): A randomized, placebo-controlled trial / M. Elkind [et al.] // *Neurology*. – 2020. – Vol.95. – №8. – P.e1091–e1104.
103. Secades, J.J. «Citicoline: pharmacological and clinical review, 2022 update». «Citicolina: revisión farmacológica y clínica, actualización 2022» / J.J. Secades, P. Gareri. // *Revista de neurologia*. – 2022. – Vol.75. – P.S1-S89.
104. Application of Citicoline in Neurological Disorders: A Systematic Review / P. Jasielski [et al.] // *Nutrients*. – 2020. – Vol.12. – №10. – P.3113.
105. Agarwal, S. Is aura around citicoline fading? A systemic review / S. Agarwal, B.M. Patel // *Indian Journal of Pharmacology*. – 2017. – Vol.49. – №1. – P.4-9.
106. Secades, J.J. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2010 update / J.J. Secades // *Revue Neurology*. – 2011. – Vol.52. – №2. – P.1-62
107. Neuroprotective and Anti-neuroinflammatory Properties of Ebselen Derivatives and Their Potential to Inhibit Neurodegeneration / A.D. Landgraf [et al.] // *ACS chemical neuroscience*. – 2020. – Vol.11. – Vol.19. – P.3008–3016.
108. Mechanisms of ebselen as a therapeutic and its pharmacology applications / J. Wang [et al.] // *Future medicinal chemistry*. – 2020. – Vol.12. – №23. – P.2141–2160.
109. Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): a randomised, double-blind phase 2b/3 trial / A. Chamorro [et al.] // *The Lancet Neurology*. – 2014. – Vol.13. – №5. – P.453–460.

110. Скворцова, В.И. Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности мексидола в комплексной терапии ишемического инсульта в остром периоде / В.И. Скворцова [и др.] // Инсульт. – 2006. – Т.18. – С.47-54.
111. Стаховская, Л.В. Результаты рандомизированного двойного слепого мультицентрового плацебо-контролируемого в параллельных группах исследования эффективности и безопасности мексидола при длительной последовательной терапии у пациентов в остром и раннем восстановительном периодах полушарного ишемического инсульта (ЭПИКА) / Л.В. Стаховская // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – Т.117. – №3. – С.55-65.
112. Воронина, Т.А. Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике / Т.А. Воронина // РМЖ. – 2016. – Т.24. №7. – С.434-438.
113. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении / Ю.И. Кирова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2020. – Т.120. – №1. – С.62-69.
114. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility / S. Dodd [et al.] // Expert Opinion on Biological Therapy. – 2008. – Vol.8. – №12. – P.1955–1962.
115. Antioxidant effects of N-acetylcysteine on the male reproductive system: A systematic review / A. Ghafarizadeh, M. Malmir, S. Naderi Noreini, T. Faraji // Andrologia. – 2020. – Vol.53. – №1. – P.e13898.
116. Neuronext Clinical Trials Network NN104 Investigators. Final Results of the RHAPSODY Trial: A Multi-Center, Phase 2 Trial Using a Continual Reassessment Method to Determine the Safety and Tolerability of 3K3A-APC, A Recombinant Variant of Human Activated Protein C, in Combination with Tissue Plasminogen Activator, Mechanical Thrombectomy or both in Moderate to Severe Acute Ischemic Stroke / P.

- Lyden [et al.] // *Annals of neurology*. – 2019. – Vol.85. – №1. – P.125–136.
117. Sharma, S. Repurposing metformin to treat age-related neurodegenerative disorders and ischemic stroke / S. Sharma, S. Nozohouri, S. Vaidya, T. Abbruscato // *Life Sciences*. – 2021. – Vol. 274. – P.119343.
118. Hypothesized neuroprotective effect of minocycline against COVID-19-induced stroke and neurological dysfunction: possible role of matrix metalloprotease signaling pathway / A.A. Shahrivar // *Biologia*. – 2023. – Vol.77. – №.10. – P.3027–3035.
119. The mechanisms of minocycline in alleviating ischemic stroke damage and cerebral ischemia-reperfusion injury / K. Zhao [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2023. – Vol.955. – P.175903.
120. Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate promote post-ischemic recovery in mice / Y. Yao [et al.] // *Translational stroke research*. – 2016. – Vol.7. – №6. – P.535–547.
121. Dimethyl fumarate improves white matter function following severe hypoperfusion: involvement of microglia/macrophages and inflammatory mediators / J.H. Fowler [et al.] // *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2018. – Vol.38. – №8. – P.1354–1370.
122. Uric acid neuroprotection associated to IL-6/STAT3 signaling pathway activation in rat ischemic stroke / V.A. Aliena [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2020. – Vol. 58. – №1. – P.408-423.
123. The future of neuroprotection in stroke / A. Chamorro [et al.] // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 2021. – Vol.92. – P.129-135.
124. Comparative Lipid-Lowering/Increasing Efficacy of 7 Statins in Patients with Dyslipidemia, Cardiovascular Diseases, or Diabetes Mellitus: Systematic Review and Network Meta-Analyses of 50 Randomized Controlled Trials / X. Zhang [et al.] // *Cardiovascular therapeutics*. – 2020. – Vol. 2020. – P.3987065.

125. Mori, T. Pre-Stroke Statin Use Is Associated with Mild Neurological Deficits at the Onset of Acute Ischemic Stroke / T. Mori, K. Yoshioka, Y. Miyazaki // *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. – 2022. – Vol. 9. – №11. – P.396.
126. Napoli E., Recent advances in stem cell-based therapeutics for stroke / E. Napoli, C.V. Borlongan // *Transl Stroke Res*. – 2016. – Vol.7. – P. 452–457.
127. Immunomodulatory therapeutic strategies in stroke *Front Pharmacol*. / K. Malone [et al.]. – 2019. – Vol.10. – P.630.
128. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases / R. Mattioli, A. Francioso, L. Mosca, P. Silva // *Molecules*. – 2020.- Vol. 25. – №17. – P.3809.
129. Neuroprotective Strategies for Stroke by Natural Products: Advances and Perspectives / A. Liu [et al.] // *Current neuropharmacology*. – 2023. – Vol. 21. – №11. – P. 2283-2309.
130. Neuroprotective Phytochemicals in Experimental Ischemic Stroke: Mechanisms and Potential Clinical Applications / H. Xu [et al.] // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2021. – Vol.2021. – P. 6687386.
131. Lu, W. Flavonoids and ischemic stroke-induced neuroinflammation: Focus on the glial cells / W. Lu, Z. Chen, J. Wen // *Biomedecine & pharmacotherapie*. – 2024. – Vol. 170. – P. 115847.
132. Medicinal Plants with Acetylcholinesterase Inhibitory Activity: Therapeutic Potential of Brazilian Plants for the Treatment of Alzheimer's Disease / F.G da Silva Oliveira [et al.] // *Pharmacognosy Reviews*. – 2019. – Vol.13. – №.26. – P.45-49.
133. Current trends in natural products for the treatment and management of dementia: Computational to clinical studies / R.K. Singla [et al.] // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2023. – Vol. 147. – P.15106.

134. Marine natural flavonoids: chemistry and biological activities / B.T. Martins [et al.] // *Natural product research*. – 2019. – Vol.33. – №22. – P. 3260–3272.
135. Spiro-Flavonoids in Nature: A Critical Review of Structural Diversity and Bioactivity / L. Pecio [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol.28. – №14. – P.5420.
136. Liga, S. Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques / S. Liga, C. Paul, F. Péter // *Plants (Basel, Switzerland)*. – 2023. – Vol.12. – №14. – P. 2732.
137. Al Zahrani, N.A. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review / N.A. Al Zahrani, R.M. El-Shishtawy, A.M. Asiri // *European journal of medicinal chemistry*. – 2020. – Vol.204. – P.112609.
138. Beneficial effects of flavonoids on cardiovascular diseases by influencing NLRP3 inflammasome / H.Y. Fang [et al.] // *Inflammopharmacology*. – 2023. – Vol.31. – №4. – P. 1715-1729.
139. Therapeutic effects and molecular mechanisms of natural products in thrombosis / M.H. Yuan [et al.] // *Phytotherapy research*. – 2024. – Vol.38. – №5. – P. 2128–2153.
140. Roles of flavonoids in ischemic heart disease: Cardioprotective effects and mechanisms against myocardial ischemia and reperfusion injury / H. Xu [et al.] // *Phytomedicine*. – 2024. – Vol.126. – P.155409.
141. Азарова, О.В., Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия / О.В. Азарова, Л.П. Галактионова // *Химия растительного сырья*. – 2012. – № 4. – С. 61–78.
142. Diosmin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through activating JAK2/STAT3 signal pathway in mice / X. Liu [et al.] // *Neuroscience*. – 2014. – Vol.268. – P.318-327.

143. Mohammadi, A. The Functional Roles of Curcumin on Astrocytes in Neurodegenerative Diseases / A. Mohammadi [et al.] // Neuroimmunomodulation. – 2022. – Vol.29. – №1. – P.4–14.
144. Natural Antioxidants Improve the Vulnerability of Cardiomyocytes and Vascular Endothelial Cells under Stress Conditions: A Focus on Mitochondrial Quality Control / Chang X. [et al.] // Oxid Med Cell Longev. – 2021. – Vol. 22. – №2021. – P.6620677.
145. Neuroprotective Potential of Chrysin: Mechanistic Insights and Therapeutic Potential for Neurological Disorders / A. Mishra [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol.26. – №21. – P.6456.
146. Theaflavin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by activating the Nrf2 signalling pathway in vivo and in vitro / Z. Li [et al.] // Biomedicine & pharmacotherapy. – 2021. – Vol.134. – P.111097.
147. Куркин, В.А. Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов: монография. – Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, 2015. – 240 с.
148. Ruwizhi N. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy / N. Ruwizhi, B.A. Aderibigbe // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol.21. – №16. – P.5712.
149. Qu, Y. Gallic acid attenuates cerebral ischemia/re-perfusion-induced blood-brain barrier injury by modifying polarization of microglia / Y. Qu, L. Wang, Y. Mao // Journal of immunotoxicology. – 2022. – Vol.19. – №1. – P.17-26.
150. Cyanidin-3-O-glucoside attenuates endothelial cell dysfunction by modulating miR-204-5p/SIRT1-mediated inflammation and apoptosis / Z. Wang [et al.] // Biofactors. – 2020. – Vol.46. – №5. – P.803-812.
151. Hyperoside protects against oxidative stress-mediated photoreceptor degeneration: therapeutic potentials for photoreceptor degenerative diseases / Li, D. [et al.] // Journal of translational medicine. – 2023. – Vol. 21. – №1. – P.569.

152. Hyperoside Reduces Rotenone-induced Neuronal Injury by Suppressing Autophagy / H. Fan [et al.] // *Neurochemical research*. – 2021. – Vol.46. – №12. – P.3149-3158.
153. Soy flavonoids prevent cognitive deficits induced by intra-gastrointestinal administration of beta-amyloid / J. Liu [et al.] // *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. – 2020. – Vol.141. – P.111396.
154. Rodríguez-Arce, E. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases / E. Rodríguez-Arce, M. Saldias // *Biomedecine & pharmacotherapie*. – 2021. – Vol.143. – P. 112236.
155. Anthocyanins: Promising Natural Products with Diverse Pharmacological Activities / J. Liu [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol.26. – №13. – P.3807.
156. Alkadi, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants / H. Alkadi // *Infect Disord Drug Targets*. – 2020. – Vol.20. – №1. – P.16–26.
157. Higher Habitual Dietary Intakes of Flavanols and Anthocyanins Differentially Associate with Lower Incidence of Ischemic Stroke Subtypes-A Follow-Up Analysis / B.H. Parmenter [et al.] // *The Journal of nutrition*. – 2023. – Vol.153. – 11 – P. 3280–3286.
158. Anthocyanins: Molecular Aspects on Their Neuroprotective Activity // C.A. Zaa // *Biomolecules*. – 2023. – Vol.13. – №11. – P.1598.
159. Lourith N., Improved stability of butterfly pea anthocyanins with biopolymeric walls / N. Lourith, M. Kanlayavattanakul // *J. Cosmet. Sci.* – 2020. – Vol.71. – P.1–10.
160. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin / S. Akhavan Mahdavi [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – Vol.85. – P.379–385.
161. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential

- method: Collaborative study / J. Lee [et al.] // *J. AOAC Int.* – 2005. – Vol.88. – P.1269–1278.
162. Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study / R. Zamora-Ros [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2011. – Vol.106. – P. 1090–1099.
163. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases / R. Mattioli [et al.] // *Molecules.* – 2020. – Vol.25. – №17. – P.3809.
164. Oppi, S., Mouse models for atherosclerosis research—which is my line? / S. Oppi, T.F. Lüscher, S. Stein // *Front. Cardiovasc. Med.* – 2019. – Vol.6. – P.46.
165. Malvidin alleviates mitochondrial dysfunction and ROS accumulation through activating AMPK- α /UCP2 axis, thereby resisting inflammation and apoptosis in SAE mice / P. Zhao [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2023. – Vol.13. – P.1038802.
166. Antiamnesic Potential of Malvidin on Aluminum Chloride Activated by the Free Radical Scavenging Property / S.J. Gilani [et al.] // *ACS Omega.* – 2022. – Vol. 7. – P.24231–24240.
167. Kang H.J., Anthocyanin structure and ph dependent extraction characteristics from blueberries (*Vaccinium corymbosum*) and chokeberries (*Aronia melanocarpa*) in subcritical water state / H.J. Kang, M.J. Ko, M.S. Chung // *Foods.* – 2021. – Vol.10. – P.527.
168. Cognitive response to fish oil, blueberry, and combined supplementation in older adults with subjective cognitive impairment / R.K. McNamara [et al.] // *Neurobiol. Aging.* – 2018. – Vol.64. – P.147–156.
169. Anthocyanin-rich black elderberry extract improves markers of HDL function and reduces aortic cholesterol in hyperlipidemic mice / N. Farrell [et al.] // *Food Funct.* – 2015. – Vol.6. -P. 1278–1287.
170. Lee, J., Examining the impact of grape consumption on brain metabolism and cognitive function in patients with mild decline in cognition: A double-

- blinded placebo-controlled pilot study // J. Lee, N. Torosyan, D.H. Silverman // *Exp. Gerontol.* – 2017. – Vol.87. – P.121–128
171. Kumar, S. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview / S. Kumar, A.K. Pandey // *The Scientific World Journal.* – 2013. – Vol.16. – P. 27-50.
172. Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: Applications for natural compounds from medicinal herbs / T. Zhu [et al.] // *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* – 2022. – Vol.148. – P.112719.
173. Tardiolo, G. Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases / G. Tardiolo, P. Bramanti, E. Mazzon // *Molecules.* – 2018. – Vol.13, - №23. – P. E3305.
174. Назарова, Л.Е. Влияние кислоты феруловой на зону некроза, возникающего в результате окклюзии средней мозговой артерии /Л.Е. Назарова, И.Н. Дьякова // *Медицинский вестник Башкортостана.* – 2011. – №3. – С.133-135.
175. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев [и др.] – М., 2005. – 832 с.
176. Bederson, J.B. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination / J.B. Bederson [et al.] // *Stroke.* – 1986. – Vol.17. – №3. – P.472-476.
177. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон. – М.: Изд-во «Высшая школа», 1991. – С. 5–30.
178. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Т. А. Воронина, Р. У. Островская // – М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – С. 153–161.

179. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
180. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide / N. Sestakova [et al.] // *Interdisciplinary toxicology*. – 2013. – Vol.6. – №3. – P.126-135.
181. 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.
182. Bondarenko, N.A. Anxiety and the Problem of “Inattentive” Animals in Water Maze Tests / N.A. Bondarenko // *The Russian Journal of Cognitive Science*. – 2017. – Vol. 4. – №4. – P.45- 51.
183. Бондаренко, Н.А. Избирательный эффект нейролептиков на нарушение дофамин-зависимого поведения у крыс в тесте экстрополяционного избавления / Н. А. Бондаренко // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 1990. – Т. 11. – С.506-508.
184. Bernauer, W. Inhibiting effect of dexamethasone on evolving myocardial necrosis in coronary-ligated rats, with and without reperfusion / W. Bernauer // *Pharmacology*. – 1985. – Vol. 31. – №6. – P.328-336.
185. Сернов Л.Н., Гацура В. В. Элементы экспериментальной фармакологии / Л.Н. Сернов, В.В. Гацура – М., 2000. – 352 с.
186. Hayashi, T. Vascular Endothelial Growth Factor: Protection Against Ischemic Brain Damage with MCA Occlusion in Rats / T. Hayashi, Y. Itoyama, K. Abe // *Ischemic Blood Flow in the Brain*. – Springer, Tokyo. – 2001. – P.120-127.
187. Facts and recommendations about Total Homocysteine Determinations: an Expert Opinion / Refsum H. [et al.] // *Clin Chem*. – 2004. – Vol.50. – P.3-32.
188. Тюренков, И.Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков //

- Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71. – №1. – С.49-51.
189. Бокерия, Л. А. Новейшие инновационные методы сосудистой диагностики / Л.А. Бокерия, Н.Н. Петрищев, М.Б. Гирина // Поликлиника. – 2013. – №3–1. – С.64-65.
190. Born, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V.R. Born // Nature. – 1962. – Vol.194. – №4832. – P.927-929.
191. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / З.А. Габбасов [и др.] // Лабораторное дело. – 1989. – Т.10. – С.15-18.
192. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С.16-19.
193. Чумаков, В.Н. Количественный метод определения активности цинк-, медь- зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале / В.Н. Чумаков, Л.Ф. Осинская // Вопр. мед. химии. – 1977. – №5. – С.712-716.
194. Pierce S. Glutathione peroxidase activities from rat liver / S. Pierce, A.L. Tappel // Biochim. et biophys. Acta. - 1978. - Vol. 523, No 1. – P. 27 – 36.
195. Methods for assessing mitochondrial quality control mechanisms and cellular consequences in cell culture / M. Redmann [et al.] // Redox biology. – 2018. – Vol. 17. – P. 59–69.
196. N-acetylcysteine amide preserves mitochondrial bioenergetics and improves functional recovery following spinal trauma / S.P. Patel [et al.] // Experimental neurology. – 2014. – Vol. 257. – P.95-105.
197. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
198. Действие Nd^{3+} на кальций-зависимые процессы в изолированных митохондриях сердца крысы и сердечной мышце лягушки / Коротков С.М. [и др.] // Биологические мембраны. – 2019. – Т.35. – С.200–207.

199. Аверченко, Е.А. Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса / Е.А. Аверченко, Н.С. Кавок, А.М. Степаненко // *Биофиз. вестник*. – 2009. – Т. 22. – №1. – С.49-56.
200. Calcium Assay Kit (Colorimetric) (ab102505) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.abcam.com/ab102505
201. Гланц С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
202. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов – М.: Изд-во РАМН, 2000. – 52 с.
203. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – Т. 305. – 312 с.
204. Champe, P. Biochemistry. Lippincott's Illustrated Reviews 4th ed. / P. Champe, R. Harvey. – Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008. — P. 261-276.
205. Маслюкова, А.В. Биохимические маркеры перенесенного острого нарушения мозгового кровообращения / А.В. Маслюкова, И. К. Томилова, Е.А. Баклушина // *Вестник Ивановской медицинской академии*. – 2015. – Т.20. – №1. – С.37-44.
206. Early detection of elevated lactate levels in a mitochondrial disease model using chemical exchange saturation transfer (CEST) and magnetic resonance spectroscopy (MRS) at 7T-MRI / Saito S. [et al.] // *Radiological physics and technology*. – 2019. – Vol.12. – №1. – P.46-54.
207. Султанов, В.С. Церебропротекторные и энергостабилизирующие эффекты полипренольного препарата ропрена при ишемии головного мозга у крыс/ В.С. Султанов, И.В. Зарубина, П.Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2010. – Т.8. – № 3. – С.31–47.

208. Оганесян, Э.Т. Использование квантово-химических параметров для прогнозирования антирадикальной (НО·) активности родственных структур, содержащих циннамоильный фрагмент. I. Производные коричной кислоты, халкона и флавона / Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин, А.А. Глушко // Фармация и фармакология. – 2019. – Т.7. – №1. – С.53-66.
209. Salvianolic acid B attenuates mitochondrial stress against A β toxicity in primary cultured mouse neurons / Y. He [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2018. – Vol.498. – №4. – P.1066-1072.
210. Caffeic acid ameliorates early and delayed brain injuries after focal cerebral ischemia in rats / Y. Zhou [et al.] // Acta Pharmacologica Sinica. – 2006. – Vol.27. – №9. – P.1103–10.
211. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice / C.Y. Chao, M.C. Mong, K.C. Chan, M.C. Yin // Molecular Nutrition and Food Research. – 2010. – Vol.54. – №3. – P.388–95.
212. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice / U.J. Jung [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2006. – Vol.318. – №2. – P. 476–83.
213. Дозозависимое влияние бетаметазона на суставной хрящ (экспериментальное исследование) / А.Н. Нуриахметов [и др.] // Гений ортопедии. – 2021. – Т.27. – №1.
214. An ABC of Drug-Related Problems / R.H.V. Meyboom [et al.] // Drug Safety. – 2000. – Vol.22. – №6. – P.415-423.
215. Овчинникова, Е.А. Основные механизмы развития неблагоприятных побочных реакций / Е.А. Овчинникова, Л.К. Овчинникова // Качественная клиническая практика. – 2004. – №1. – С.57-66.

216. Дисфункция эндотелия при ишемических нарушениях мозгового кровообращения / З.А. Суслина [и др.] // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2008. – Т.2. – №1. – С.4-11.
217. Mechanisms of Acupuncture in the Regulation of Oxidative Stress in Treating Ischemic Stroke / X.T. Su, [et al.] // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 7875396.
218. Forman, H. J. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy / H.J. Forman, H. Zhang // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2021. – Vol. 20. – №9. – P.689-709.
219. Yang, J.L. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke / J.L. Yang, S. Mukda, S.D. Chen // *Redox Biology*. – 2018. – №16. – P.263-275.
220. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia / K. Niizuma [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol.1802. – №1. – P.92-99.
221. Leonard, J.V. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects / J.V. Leonard, A.H. Schapira // *Lancet*. – 2000. – Vol.355. – №9201. – P.389-394.
222. Kalogeris, T. Mitochondrial reactive oxygen species: a double-edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning / T. Kalogeris, Y. Bao, R.J. Korthuis // *Redox biology*. – 2014. – Vol.2. – P.702-714.
223. Blueberry and malvidin inhibit cell cycle progression and induce mitochondrial-mediated apoptosis by abrogating the JAK/STAT-3 signalling pathway / A.B. Baba, R. Nivetha, I. Chattopadhyay, S. Nagini // *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. – 2017. – Vol.109. – №1. – P.534-543.
224. Cardioprotective Effects of Malvidin Against Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats: A Mechanistic Study / H. Wei [et al.] // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. – 2017. – Vol.23. – P.2007-2016.

225. An Overview on Dietary Polyphenols and Their Biopharmaceutical Classification System (BCS) / F. Truzzi [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol.22. – №11. – P.5514.
226. Malvidin and its derivatives exhibit antioxidant properties by inhibiting MAPK signaling pathways to reduce endoplasmic reticulum stress in ARPE-19 cells / X. Liu [et al.] // Food and Function. – 2021. – Vol.12. – №16. – P.7198-7213.
227. Identification of Stabilization of Malvid Anthocyanins and Antioxidant Stress Activation via the AMPK/SIRT1 Signaling Pathway / F. Zheng [et al.] // Evid Based Complement Alternat Med. – 2021. – Vo.2021. – P.9934646.
228. Ischaemic stroke / B.C.V. Campbell [et al.] // Nature reviews. Disease primers. – 2019. – Vol.5. – №1. – P.70.
229. Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct - relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort / M. Fiorelli [et al.] // Stroke. – 1999. – Vol.30. – №11. – P.2280–2284.
230. Real-world outcomes of acute ischemic stroke treatment with intravenous recombinant tissue plasminogen activator / K.A. Betts [et al.] // Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2017. – Vol.26. – №9. – P.1996–2003.
231. Dietary Anthocyanins and Stroke: A Review of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies / B.N. Manolescu [et al.] // Nutrients. – 2019. – Vol.11. – №7. – P.1479.
232. Aboonabi, A. Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2-ARE as an indicator and modulator of redox / A. Aboonabi, I. Singh // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2015. – Vol.72. – P.30–36.
233. Possible mediators involved in de-creasing peripheral vascular resistance with blackcurrant concentrate (BC) in hind-limb perfusion model of the rat

- / K. Iwasaki-Kurashige [et al.] // *Vascular Pharmacology*. – 2006. – Vol.44. – P.215–223.
234. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals / Y. Zhu [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2011. – Vol.57. – P.1524–1533.
235. Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial / S.A. Johnson [et al.] // *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. – 2015. – Vol.115. – P.369–377.
236. Гипергомоцистеинемия – предиктор тяжести инсульта на фоне обширности повреждения мозгового вещества / А.Ю. Полушин [и др.] // *Вестник Российской военно- медицинской академии*. – 2013. – Т.44. – №4.
237. MitoQ protects against hyperpermeability of endothelium barrier in acute lung injury via a Nrf2-dependent mechanism / M. Cen [et al.] // *Redox biology*. – 2021. – Vol.41. – P.101936.
238. Li, Y. Effect of inhibiting mitochondrial fission on energy metabolism in rat hippocampal neurons during ischemia/reperfusion injury / Y. Li, M. Wang, S. Wang // *Neurological Research*. – 2016. – Vol.38. – P.1027–1034.
239. Evidence of oxidative stress and secondary mitochondrial dysfunction in metabolic and non-metabolic disorders / K.M. Stepien [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2010. – Vol.6. – P.71.
240. Mdivi-1 prevents apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in primary hippocampal cells via inhibition of reactive oxygen species-activated mitochondrial pathway / J. Wang [et al.] // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2014. – Vol.23. – P.1491–1499.
241. Mitochondrial membrane potential / L.D. Zorova [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2018. – Vol.552. – P.50–59.

242. Mitochondria in ischemic stroke: new insight and implications / Q. Hu [et al.] // *Aging and disease*. – 2018. – Vol.9. – P. 924–937.
243. Remote ischemic postconditioning inhibited mitophagy to achieve neuroprotective effects in the rat model of cardiac arrest / Y. Huang [et al.] // *Neurochemical Research*. – 2021. – Vol.46. – P.573–583.
244. Mitochondria: The calcium connection / L. Contreras, I. Drago, E. Zampese, I. Pozzan // *Biochimica et Biophysica*. – 2010. – Vol.1797.– P.607-618
245. De Brito, O.M. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria / O.M. De Brito, L. Scorrano // *Nature*. – 2008. – Vol.456. – P.605–610.
246. Haworth, R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site / R.A. Haworth, D.R. Hunter // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1979. – Vol.195. – №2. – P.460–467.
247. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. / B. Glancy, W.T. Willis, D.J. Chess, R.S. Balaban // *Biochemistry*. – 2013. – Vol.52. – P.2793–2809.
248. Arnold, S. Cell Respiration is Controlled by ATP, an Allosteric Inhibitor of Cytochrome-c Oxidase / S. Arnold, B. Kadenbach // *European Journal of Biochemistry*. – 1997. – Vol.249. – P.350–354.
249. Stimulation of H₂O₂ generation by calcium in brain mitochondria respiring on alpha-glycerophosphate / L. Tretter, K. Takacs, K. Kövér, V. Adam-Vizi // *Journal of neuroscience research*.– 2007. – Vol.85. – P.3471–3479.
250. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: pathogenesis and treatment / M. Golpich [et al.] // *CNS neuroscience and therapeutics*. – 2017. – Vol.23. – №1. – P.5–22.
251. Moro, L. Mitochondria at the Crossroads of Physiology and Pathology / L. Moro // *Journal of clinical medicine*. – 1971. – Vol.9. – №6.

252. Sorrentino, V. Repairing mitochondrial dysfunction in disease / V. Sorrentino, K.J. Menzies, J. Auwerx // Annual review of pharmacology and toxicology. – 2018. – Vol.58. – P.353–389.
253. Abnormal Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases / X. Yan [et al.] // Frontiers in cellular neuroscience. – 2020. – Vol.14. – P.138.