

**Сысоев Юрий Игоревич**

**Влияние адренотропных и холинетропных средств на восстановление двигательных функций при поражении ЦНС**

**14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология**

**03.03.01 - Физиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2019

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

**Научные руководители:** доктор медицинских наук, профессор **Оковитый Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук **Мусиенко Павел Евгеньевич**.

**Официальные оппоненты:**

**Волчегорский Илья Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, заведующий

**Мейгал Александр Юрьевич**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет», кафедра физиологии человека и животных, патофизиологии, гистологии, заведующий; лаборатория новых методов физиологических исследований, заведующий

**Ведущая организация** - Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск

**Защита состоится** «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. на заседании Диссертационного совета Д001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») (197376, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ») по адресу 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») по адресу: 1973764, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ» и на сайте: <https://iemspb.ru/soiskatel-kand03/sysoev-ji/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
доктор биологических наук

**Хныченко Людмила Константиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Интегративный контроль позы и локомоции – одна из важнейших функций двигательных центров. Данные центры должны обеспечивать необходимую степень возбуждения и торможения мотонейронов, и, как следствие, координированное сокращение скелетных мышц, необходимое для успешного выполнения возникающих моторных задач. Супраспинальные центры действуют на нейронные сети спинного мозга через нисходящие аксоны, которые, достигая спинального уровня действуют на специфические пре- и постсинаптические рецепторы. При этом успешная локомоция во многом зависит от скоординированного высвобождения в различных отделах спинного мозга таких медиаторов как норадреналин, серотонин, ацетилхолин и др. [Jordan L.M., 2008].

Большой интерес для теоретической и практической медицины представляют препараты, оказывающие влияние на различные центры головного мозга, нисходящие супраспинальные системы, спинальные сети и другие структуры, управляющие позой и локомоцией. Несмотря на то, что группа нейропротекторных/нейрореабилитационных средств весьма разнообразна, именно препараты с адрено- и холинотропным действием являются одними из наиболее эффективных в лечении повреждении ЦНС [Chau C., 1998a; Musienko P.E., 2011].

Агонисты альфа-2 адренорецепторов в условиях эксперимента снижают выраженность неврологического дефицита и улучшают гистоморфологическую картину головного мозга у животных после инсульта при введении до или во время ишемии [Yanli L., 2016]. Мета-анализ, включающий в себя 9 рандомизированных плацебо-контролируемых исследований с участием 879 пациентов с ишемией головного мозга показал, что альфа-2 адреномиметик дексмететомидин способен уменьшать выраженность неврологического дефицита, снижая выброс воспалительных медиаторов и нейроэндокринных гормонов, в то же время поддерживая внутричерепной гомеостаз и снижая объемы повреждения головного мозга [Jiang L., 2017].

Холинотропные средства традиционно применяются в терапии нейродегенеративных заболеваний [Jacobson S.A., 2008], коррекции последствий ишемического инсульта [Barrett K.M., 2011], а также черепно-мозговой травмы [Tenovuo O.S., 2006]. Производные этаноламина, традиционно рассматриваются как непрямые холиномиметики, благодаря способности увеличивать образование ацетилхолина в ЦНС. Несмотря на то, что они имеют много общих фармакологических свойств, открываются все новые и новые механизмы действия для каждого из них, что делает данные соединения интересными для фармакологического изучения.

**Степень научной разработанности темы.** Физиологическая роль подтипов альфа-2 адренорецепторов неоднократно изучалась с использованием различных экспериментальных моделей. Так, было показано, что активация альфа-2<sub>A</sub> AP ростральной вентролатеральной области продолговатого мозга у мышей вызывает гипотензию [MacMillan, L. V., 1996], а голубого пятна (locus coeruleus) – седацию [Kable, J. W., 2000]. Как показали эксперименты с использованием нокаутных животных, через альфа-2<sub>A</sub> AP реализуются также антиноцицептивный и гипотермический эффекты альфа-2 адреномиметиков, например дексмететомидина [Hunter, J. C., 1997]. Относительно мало известно о физиологической роли альфа-2<sub>B</sub> и альфа-2<sub>C</sub> подтипов AP. Например, в то время как альфа-2<sub>B</sub> AP вовлечены в регуляцию сосудистого тонуса [Makaritsis, K. P., 1999], альфа-2<sub>C</sub> подтип не принимает участия в реализации сердечно-сосудистых эффектов или других «классических» эффектов альфа-2 адреномиметиков, например, седации [Kable, J. W. и др., 2000], но имеются данные о том, что у мышей данный подтип опосредует стресс-зависимое депрессивное поведение [Sallinen, J., 1997], а также некоторые когнитивные функции [Björklund, M., 1998]. Также было показано, что альфа-1 и альфа 2 адренорецепторы принимают участие в инициации и/или модуляции локомоции. Например, введение агониста

альфа-2 адренорецепторов клонидина вызывало появление хорошо организованного, длительного цикла шагания у спинализированных кошек. [Chau, С., 1998b], однако на сегодняшний день роль подтипов альфа-2 адренорецепторов в регуляции локомоторной функции плохо изучена.

В серии исследований мафедина, синтезированный на кафедре органической химии Санкт-Петербургского Химико-Фармацевтического университета продемонстрировал гипотензивную активность, обусловленную возбуждением альфа-2 адренорецепторов в ЦНС [Анисимова, Н. А., 1984]. В сравнении с клонидином он оказывал более медленное, равномерное и длительное гипотензивное действие. После отмены препарата у экспериментальных животных не отмечалось резкого повышения артериального давления (синдрома отмены), характерного для клонидина [Анисимова, Н. А., 1984]. Исследований мафедина в качестве нейропротекторного или нейрореабилитационного средства не проводилось.

Производные этаноламина изучаются в качестве нейропротекторных средств с 70-х годов прошлого века. По мнению большинства авторов, соединения, имеющие этаноламиновою структуру, проникают через гематоэнцефалический барьер, захватываются нейронами и клетками нейроглии, и непосредственно в нейронах метилируется до холина, включающегося в синтез ацетилхолина – одного из основных нейромедиаторов, участвующих в процессах обучения и памяти [Kewitz, Н., 1976]. Новое производное диэтилэтанолamina бис{2-((2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси)-N, N-диэтилэтанаминия} бутандиоат (ФДЭС) в условиях эксперимента на модели ишемии головного мозга у крыс улучшало координацию движений, а также увеличивало общую двигательную и поисково-исследовательскую активность по сравнению с контрольными животными [Титович, И. А., 2017]. На моделях острой гемической, гистотоксической и гипоксической гипоксии была продемонстрирована антигипоксическая активность ФДЭС [Титович, И. А., 2016].

**Цель исследования.** Изучить влияние средств с адренотропным (6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (мафедина)) и холинотропным (бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат (ФДЭС)) действием на восстановление двигательных функций при травматическом повреждении ЦНС.

#### **Задачи:**

1. Выявить роль альфа-2<sub>A</sub>-, 2<sub>B</sub>- и 2<sub>C</sub>-адренорецепторов в нейромодуляции локомоции.
2. Оценить избирательность действия мафедина на альфа-2 адренорецепторы.
3. Изучить механизм нейропротекторного эффекта ФДЭС.
4. Исследовать влияние мафедина и ФДЭС на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы.

**Научная новизна.** В работе впервые показана роль различных подтипов альфа-2 адренорецепторов в механизмах регуляции локомоторной функции. На модели дцеребрированной кошки в остром эксперименте установлено, что альфа-2<sub>B</sub> рецепторы способны регулировать паттерн шагания за счет модуляции афферентной иннервации по волокнам IV типа, а также изменения работы проприоспинальных связей. Наибольшее значение в локомоторной функции принимают альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторы. Помимо регуляции работы проприоспинальных связей, а также афферентной иннервации, необходимой для инициации локомоции, данные рецепторы принимают участие в нормальной работе моносинаптических и полисинаптических рефлексов поясничного отдела спинного мозга.

С помощью модели зебраданио в тесте «Новый аквариум» показано, что 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (мафедина) является агонистом альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов, в то время как нейропротекторные свойства бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N, N-диэтилэтанаминия} бутандиоата (ФДЭС) реализуются благодаря активации нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) в постсинаптические дендритные шипики.

Оценено влияние мафедина и ФДЭС на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы, вызванной методом «контролируемого корти-

кального удара». Его введение крысам в дозе 2,5 мг/кг спустя час после ЧМТ и в течение последующих 6 дней приводит к увеличению их общей двигательной активности и улучшению функции передних и задних конечностей без негативного влияния на поведенческие показатели. При этом уменьшается объем повреждения головного мозга, а также интенсивность воспалительных процессов в очаге травмы. Положительный эффект исследуемого соединения опосредуется через альфа-2 адренорецепторы.

Применение нового производного диэтилэтанолamina в дозе 10 мг/кг у животных после черепно-мозговой травмы позволяет достичь улучшения состояния моторной функции передней и задней конечностей, расположенных контрлатерально к месту повреждения, а также к увеличению показателей общей двигательной (ОДА) и поисково-исследовательской активности (ПИА). В положительном эффекте исследуемого соединения принимает участие холинергическая система, а также нормализация нарушенной барьерной функции ГЭБ после ЧМТ.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследования позволяют рекомендовать 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (мафедина) и бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат (ФДЭС) для дальнейшего изучения в качестве потенциальных корректоров двигательных нарушений после перенесенных травм ЦНС.

Выявление роли подтипов альфа-2 адренорецепторов в регуляции локомоции позволяет вести целенаправленный поиск эффективных лекарственных средств для коррекции последствий нейротравм.

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

1. Альфа-2<sub>c</sub> адренорецепторы играют ключевую роль в регуляции двигательной функции. Их блокада приводит к негативным изменениям кинематических и электромиографических характеристик локомоторного паттерна, а также рефлекторной активности спинного мозга.

2. Мафедин уменьшает объем повреждения и интенсивность воспаления в мозге после травмы, увеличивает общую двигательную активность животных и улучшает двигательную функцию конечностей. Эффекты мафедина на двигательные поведенческие параметры связаны с активацией альфа-2<sub>c</sub> адренорецепторов.

3. ФДЭС, не влияя на объем повреждения мозга, увеличивает общую двигательную активность крыс после черепно-мозговой травмы и нормализует двигательную функцию конечностей. Нейропротекторное действие ФДЭС реализуется за счет активации нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) в постсинаптические дендритные шипики нейронов.

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

Основные результаты работы были доложены на VII и VIII Всероссийских научных конференциях студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего» (Санкт-Петербург, Россия, 2017 и 2018), III и IV Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, Россия, 2015, 2016), IV Российско-Финском симпозиуме «Технологии будущего и основные направления создания новых лекарственных средств» (Санкт-Петербург, Россия, 2017), V Российско-Финском симпозиуме (Турку, Финляндия, 2018), XIII и XIV научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», (Санкт-Петербург, Россия, 2017 и 2018), заседании Санкт-Петербургского научного общества фармакологов (Санкт-Петербург, Россия, 2017), международных конференциях «Stress and Behavior» (Санкт-Петербург, Россия, 2018) и ECNP Seminar in

Neuropsychopharmacology (Санкт-Петербург, 2018).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ из них 5 в журналах, рекомендованных ВАК. Получены патенты на изобретения №2669555 «6-Оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия и способ его получения» [Юсковец В.Н., Чернов Н.М., Яковлев И.П., Оковитый С.В., Сысоев Ю.И., Анисимова Н.А.] и №2675694 «Нейрореабилитационное средство на основе 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия» [Сысоев Ю.И., Оковитый С.В., Анисимова Н.А., Яковлев И.П., Чернов Н.М.].

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

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 191 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 252 источника, а том числе 7 на русском и 245 на английском языках. Работа иллюстрирована 88 рисунками и 15 таблицами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Фармакологические исследования функций различных подтипов альфа-2 адренорецепторов на модели децеребрированной кошки.** С целью изучения роли подтипов альфа-2 адренорецепторов в нейромодуляции кинематических параметров локомоции и электрической активности мышц была использована модель децеребрированной кошки.

Наркотизированному изофлюраном животному перед проведением децеребрации одновременно с трахеостомией осуществляли перевязку общих сонных артерий. Голову и позвоночный столб жестко фиксировали в металлической раме. Далее проводили трепанацию черепа, открывали доступ к четверохолмиям среднего мозга, осуществляли преколликкулярную постмаммилярную децеребрацию. Уровень децеребрации проверяли после опыта при диссекции ствола головного мозга. После децеребрации проводили срединный дорсальный разрез кожи спины и выполняли частичную ламинэктомию между позвонками L3 и L7. Эксперименты начинали через 6-8 ч после децеребрации.

Эпидуральную стимуляцию с оптимальными для вызова шагания параметрами (частота стимуляции 3-5 Гц, длительность стимула 0.3 мс, сила тока 70-80 мкА) выполняли шариковым электродом (диаметр 0.5 мм), закрепленным на микроманипуляторе, который подводился к нужному сегменту дорсальной поверхности спинного мозга. Индифферентный электрод имплантировали в паравертебральные мышцы. Для стимуляции использовали стимулятор фирмы A-M Systems, модель 2100.

Для вызова ходьбы у децеребрированных кошек также использовали метод механической стимуляции основания хвоста по методу Rossignol S. [Rossignol S., 2002] и эпидуральную стимуляцию одновременно с пассивными движениями передних конечностей.

Одновременно с другими сигналами производили регистрацию кинематики движений животного. Для этого выполняли видеорегистрацию с использованием видеокамер для отслеживания смещения светоотражающих маркеров, прикрепленных на лопатке, гребне подвздошной кости (таз), большом вертеле (бедро), наружном мыщелке (колени), латеральной лодыжке (голень), дистальном конце пятой плюсневой кости (плюсна), и на кончике лапы (пальцы).

Видеозаписи анализировали в покадровом режиме и рассчитывали углы в тазобедренном, коленном, голеностопном и плюснефаланговом суставах в фазы F, E1 и E3 (F – фаза максимального сгибания коленного сустава, E1 – начало фазы опоры, E3 – конец фазы опоры); длительность цикла фазы, отдельно длительность фазы опоры и переноса, мак-

симальную длину опоры; длину переноса кончика стопы, плюснефалангового, голеностопного и коленного суставов; максимальную высоту подъема кончика стопы, плюснефалангового, голеностопного и коленного суставов; внутриконечностную координацию, рассчитываемую как среднее по всем парам  $L1-L2/(L1+L2)$ , где  $L1$  и  $L2$  – длины переноса плюснефалангового сустава в соседних шагах.

Биполярные электромиографические (ЭМГ) электроды имплантировали билатерально в икроножную мышцу (*m. gastrocnemius*, MG, разгибательная мышца лодыжки), латеральную широкую мышцу бедра (*m. vastus lateralis*, VL, разгибатель колена) и большеберцовую мышцу (*m. tibialis*, TA, сгибательная мышца голени).

Анализ миографической активности проводили с помощью программ Hscip analysis 3 и Matlab R2017b (9.3.0.713579). Для каждой пачки мышц рассчитывали длительность пачки; максимальную амплитуду; площадь под кривой; межпачечный интервал.

Для каждых двух последовательных пар пачек рассчитывали асимметрию длительности пачек, как  $T1-T2/(T1+T2)$ , где  $T1$  и  $T2$  - длительности двух последовательных пачек.

Дополнительно оценивали уровень реципрокности и уровень кросскорреляции пар мышц Vic-TA L, MG L-TA L, TA L-TA R, Vic-TA R и уровень межконечностной координации по паре мышц TA L-TA R. Уровень реципрокности оценивался как суммарное отличие нормированных миограмм двух мышц, взятых в ритме шага. Уровень межконечностной координации оценивался как среднее отличие между длительностями двух соответственных пачек активности мышц TA L и TA R, TTA L-TTA R/ (TTA L+TTA R).

Анализ кривых вызванных потенциалов, полученных при эпидуральной стимуляции током от 100 мкА с частотой 0.3 Гц, включал в себя расчет максимальной амплитуды ранних компонентов (3-30 мс) и поздних компонентов (30-100 мс).

Эксперимент состоял из записи локомоции кошек без действия антагонистов (базовый уровень); после введения первого селективного антагониста альфа-2 адренорецепторов (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub> или 2<sub>C</sub>); второго базового уровня; после введения второго антагониста; третьего базового уровня; после введения третьего антагониста.

Для каждого из условий был выполнен следующий порядок тестов: 1) локомоция при ЭС стимуляции; 2) при механической стимуляции хвоста; 3) эпидуральная стимуляция при пассивных движениях передних лап; 4) запись вызванных мышечных потенциалов при ЭС.

В качестве антагониста альфа-2<sub>A</sub> адренорецепторов вводили соединение BRL 44408 (Tocris Bioscience, UK), альфа-2<sub>B</sub> рецепторов – ARC 239 (Tocris Bioscience, UK), альфа-2<sub>C</sub> рецепторов – JP 1302 (Tocris Bioscience, UK). Все соединения вводились интратекально, запись локомоции начинали спустя 20 минут после введения. Между условиями делали часовой перерыв для восстановления базового уровня.

**Использование модели зебраданио в тесте «Новый аквариум».** Исследование было выполнено на взрослых особях (5-7 месяцев) зебраданио (*Danio rerio*) дикого короткоплавникового типа («Тропик Аквариум», Россия). Соотношение самцов и самок в аутбредной популяции зебраданио составляло 1:1. Условия содержания животных обеспечивали в соответствии с существующими стандартами: по 15 особей на 20 литров бассейна с системой фильтрации воды, температура воды 22-25 °С, освещение 950-960 люкс при цикле день-ночь 10/14 часов [Westerfield M., 2000].

Поведенческое тестирование на стресс новизны осуществляли в период между 12-ю и 19-ю часами в тесте «новый аквариум» (НА), представляющий собой контейнер из оргстекла размером 20x20x5 см, условно разделенный чертой маркера на верхнюю и нижнюю половины [Egan R.J., 2009]. Непосредственно перед началом теста рыбы находились в течение 20 мин в специальных непрозрачных пластиковых контейнерах объемом 0.5 л, содержащих либо воду, либо раствор тестируемого средства в определенной концентрации.

Животные были рандомизированы на 4 экспериментальных группы, по 15 рыб в каждой: контроль и мафедин 60 мг/л (Эксперимент 1). Доза мафедина была выбрана на основании результатов предварительных экспериментов.

С помощью видеокамеры в течение 5 мин записывали движение рыб в НА. Анализ полученных файлов осуществляли с помощью программы Ethovision XT 11 (Noldus Information Technology, USA).

Для каждого животного оценивали длину пройденной дистанции (см), среднюю и максимальную скорость (см/сек) и угол поворота (град). Также подсчитывали частоту и длительность состояния низкой мобильности (область, определенная как зебраданио не менялась с порогом <20%), высокой мобильности (область, определенная как зебраданио не менялась с порогом >80%) и замираний (отсутствие смены локализации, порог был определен как: стартовая скорость – 2,00 см/с, конечная скорость – 1,75 см/с), время проведенное в верхней и нижней частях танка (сек.), частоту всплывтий и время первого всплывтия, как описано ранее [Demin K.A., 2017].

Для дальнейшего изучения механизмов действия мафедина была проведена серия экспериментов (Эксперимент 2) с использованием селективного антагониста альфа-2с AP JP 1302 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) в эквимолярной мафедину дозе 90 мг/л. Все условия эксперимента были аналогичными Экспериментам 1 и 2, за исключением того, что предварительно использовались контейнеры меньшего объема (200 мл) и с меньшим объемом растворов (150 мл).

Эффекты хронического введения мафедина (Эксперимент 3) оценивались при 7-дневном введении в дозах 1, 5 и 10 мг/кг. Тестирование животных осуществляли также в тесте «Новый аквариум» при условиях, аналогичным в Экспериментах 1 и 2.

**Исследуемые вещества.** Новая фармацевтическая субстанция 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (мафедин), была синтезирована на кафедре органической химии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии (Россия).

В качестве второго объекта исследования было выбрано соединение диэтилэтанолamina с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (N17, ФДЭС) в дозах 10 и 75 мг/кг.

Выбор доз изучаемых соединений был сделан на основании проведенных ранее экспериментов. В качестве референсных препаратов использовали средства, традиционно применяемые в терапии черепно-мозговой травмы и нарушений мозгового кровообращения - производные аминоэтанола холина альфосцерат (ФармФирма «Сотекс», Россия) в дозе 100 мг/кг и цитиколин (Феррер Интернасьональ С.А., Испания) в дозе 500 мг/кг. Также референсными средствами были: пирацетам (UCB Pharma S.A., Бельгия) в дозе 1000 мг/кг и клонидин (АО «Органика», Россия) в дозе 40 мкг/кг.

#### **Изучение механизма нейропротекторного действия производного этаноламина.**

Для изучения специфичности ФДЭС в активации STIM2-нДУВК был использован метод выключения гена с помощью РНК-интерференции. Для этого гиппокамповая культура на 7-й день культивирования ко-трансфецировалась двумя плазмидами. Первая плазида кодировала генетически кодируемый кальциевый индикатор GCaMP5.3. Вторая плазида несла ген, кодирующий малую интерферирующую РНК (siРНК), выключающую экспрессию гена TRPC6. Кальциевый имиджинг проводили на 15-16-й день. Положительным контролем в эксперименте был гиперфорин - известный специфичный активатор каналов TRPC6 [Leuner K., 2007].

Исследование выполнено совместно с Попугаевой Е.А., Чернюк Д.П., Болотовой В.Ц., Безпрозванным И.Б. на базе Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого в лаборатории молекулярной нейродегенерации.

**Моделирование черепно-мозговой травмы у крыс методом контролируемого кортикального удара.** Черепно-мозговую травму моделировали путем нанесения удара по участку сенсомоторной коры. Локализацию зоны сенсомоторной коры определяли по

атласу стереотаксических координат Paxinos G. и Watson C. [Paxinos G., 2007]. Для создания травмы животных наркотизировали внутривенным введением раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего проводили трепанацию в левой лобной части черепа над зоной сенсомоторной коры. Центр трепанационного отверстия находился на 3,0 мм роstralнее и 2,0 мм медиальнее брегмы. После этого в трепанационное отверстие, помещали подвижный стальной поршень диаметром 3 мм с ходом 4 мм, по которому с высоты 10 см ударял скользящий в стальной трубке груз весом 50 г. Высверленную пластину возвращали на место и зашивали разрез кожи [Isaev N.K., 2012].

**Методы оценки поведения и двигательные функции животных.** Поведение животных оценивали в тестах «Открытое поле» (ОП) [Hall C., 1932] и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) [Walf A.A., 2007]. Для изучения влияния исследуемых препаратов на двигательные функции были выбраны тесты «Стимулирование конечностей» (СК) [De Ryck M., 1989], «Цилиндр» (Ц) [Schallert T., 2000], «Сужающаяся дорожка» (СД) [Luong T.N., 2011] и «Staircase test» (ТМ) [Montoya C.P., 1991].

**Определение объема повреждения головного мозга и морфологический анализ области травмы.** Для определения объема очага повреждения по окончании взятия спинномозговой жидкости у крыс извлекали головной мозг и фиксировали его в течение суток в 10% забуференном формалине. На вибротоме (Campden Instruments Ltd., Великобритания) осуществляли серийные срезы мозга с шагом 100 мкм. Каждый второй срез последовательно монтировали на предметные стекла с полилизининовым покрытием (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Германия) и окрашивали раствором кризаливиолета. Далее препараты обезжировали в этиловом спирте, просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам под покровные стекла. Сканирование полученных срезов осуществляли с помощью сканера Samsung SCX-4833FD. Объем повреждения (мм<sup>3</sup>) определяли с помощью программы анализа изображений ImageJ по формуле:  $V=2 \cdot 0,1 \cdot \Sigma S_n$ , где 2·0,1 толщина двух срезов (мм);  $S_n$ , мм<sup>2</sup> – измеренная площадь повреждения в срезе;  $\Sigma$  – сумма площадей повреждений в срезах [Isaev N.K., 2012].

Гистологический материал обезжировали в спиртах возрастающей концентрации, обрабатывали хлороформом и заливали в парафин. Затем изготавливали гистологические срезы толщиной 5–7 микрон. Все микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе Leica DM 1000 (Leica, Германия), фотосъемку камерой Nikon (Nikon, США). Обработку видеоматериала проводили на персональном компьютере с помощью программы NIS-Elements F 3.2. (Nikon, США).

**Изучение белкового состава спинномозговой жидкости крыс.** После проведения всех поведенческих и функциональных тестов на 7-е сутки после травмы животных этанализировали введением двойной дозы хлоралгидрата. Взятие спинномозговой жидкости из cisterna magna осуществляли методом, описанным Nirogi R. et al. [Nigori R., 2009]. Далее ликвор центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин, забирали верхний надосадочный слой и замораживали при температуре –40°С для дальнейшего анализа.

После однократного размораживания образца спинномозговой жидкости производили определение белка по методу Lowry O.H. [Lowry O.H., 1951]. Для этого был произведен подбор разведения пробы: к 25 мкл образца добавляли физиологический раствор до объема 400 мкл, калибровочную кривую для определения белка строили в промежутке от 5 до 250 мкг белка в пробе и использовали ее линейный участок. Определение производили спектрофотометрически (DU 800, Beckman Coulter) при длине волны 750 нм против физиологического раствора. После определения содержания белка производили его электрофоретическое разделение методом диск-электрофореза по методу Laemmli U.K. [Laemmli U.K., 1970] в градиенте полиакриламидного геля от 4 до 30%. Полученная электрофореграмма окрашивалась раствором коллоидного Кумасси G-250 в 15% спирто-уксусной смеси (1:1), отмывка осуществлялась 15% спирто-уксусной смесью. Влажный гель сканировали с помощью калиброванного денситометра GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Данные обрабатывали в программе Quantity One 1-D Analysis

Software. Идентификация масс белка от 10 и более кДа проводилась методом средних пропорциональных отрезков на основании молекулярных масс стандартных белков производства Bio-Rad.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы GraphPad Prism 7.00. Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-хок тестом по Тьюки, а при распределении, отличном, от нормального - с помощью непараметрического критерия Крускала-Уоллиса с пост-хок тестом по Данну. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде среднего арифметического ( $M$ )  $\pm$  ошибка среднего ( $m$ ). В тесте «Стимулирование конечностей» данные представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль). В результатах экспериментов на модели децеребрированной кошки данные представлены в виде процентов по отношению к исходному (контролю) уровню. Достоверность различий для выборок с нормальным распределением рассчитывали с помощью непараметрического t-критерия Стьюдента, а для выборок с распределением, отличным, от нормального – с помощью U-критерия Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **Влияние селективных антагонистов альфа-2 адренорецепторов на параметры кинематики при различных видах локомоции**

При введении альфа-2<sub>A</sub> антагониста не обнаружено значимых эффектов на кинематические параметры локомоторного паттерна у децеребрированных кошек, ни при одном из видов локомоции не было эффекта, который бы наблюдался у всех испытуемых кошек.

Введение антагониста альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов в целом, ухудшало локомоторную функцию у децеребрированных кошек, поскольку при локомоции, вызванной эпидуральной стимуляцией и одновременным пассивным движением передних лап, уменьшалось сгибание коленного сустава и высота подъема колена и кончика стопы в фазу F. Однако, при локомоции, вызванной механической стимуляцией хвоста, увеличивалась максимальная длина опоры задней лапы, что можно рассматривать как положительный эффект.

Эффекты альфа-2<sub>C</sub>, как и при введении альфа-2<sub>B</sub> антагониста являются в большей степени отрицательными. Например, уменьшение длины переноса колена и снижение максимальной длины опоры при соответствующих видах локомоции могут свидетельствовать об угнетении локомоторной функции.

### **Влияние селективных антагонистов альфа-2 адренорецепторов на параметры миограмм мышц задних и передних конечностей при различных видах локомоции**

Введение антагониста альфа-2<sub>A</sub> адренорецепторов при разных видах локомоции не оказывало значимого влияния на анализируемые параметры, поскольку, у разных кошек наблюдалась разнонаправленность эффектов, однако, при локомоции, вызванной ЭС, у всех испытуемых животных наблюдалось уменьшение активности мышц-флексоров при противоположном увеличении активность мышц-экстензоров.

Введение антагониста альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов в целом, ухудшало локомоторную функцию у децеребрированных кошек при локомоции, вызванной эпидуральной стимуляцией и одновременным пассивным движением передних лап, поскольку было зафиксировано уменьшение активности мышц-экстензоров (Таблица 1).

Таблица 1 – Эффекты введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста на локомоцию и ВП

|         |                   |              |                                    |
|---------|-------------------|--------------|------------------------------------|
| Показа- | Механическая сти- | Эпидуральная | Эпидуральная стимуляция+ пассивное |
|---------|-------------------|--------------|------------------------------------|

| тель       | муляция хвоста           | стимуляция         | движение передних лап  |
|------------|--------------------------|--------------------|--|
| Кинематика | ↑длины опоры             | Отсутствие эффекта | ↑угла коленного сустава в фазу F, ↑угла голеностопного сустава в фазу F, ↓длительности фазы переноса, ↓высоты подъема коленного сустава, ↓высоты подъема кончика стопы |
| EMG        | ↑площади под кривой TA L | Отсутствие эффекта | ↓максимальной амплитуда MG L, ↓максимальной амплитуда MG R, ↓площади под кривой VL R   |
| ВП         | Отсутствие эффекта       |                    |  |

Примечание: здесь и в табл.2 данные представлены для тех случаев, когда эффект наблюдался у всех испытуемых животных; EMG – электромиографическая активность; ВП – амплитуда вызванных потенциалов.

Антагонист альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов оказывал угнетающее действие при разных видах локомоции. Помимо уменьшения максимальных амплитуд и площади под кривой мышц-экстензоров, дополнительно увеличивался их межпачечный интервал (Таблица 2).

#### **Влияние селективных антагонистов альфа-2 адренорецепторов на рефлекторные ответы мышц задних и передних конечностей при эпидуральной стимуляции спинного мозга**

Величина амплитуды ранних ответов мышц при стимуляции током 100 мкА не изменялась при введении антагонистов альфа-2<sub>A</sub> и альфа-2<sub>B</sub> рецепторов у испытуемых кошек. Однако при введении антагониста альфа-2<sub>C</sub> рецепторов JP 1302 у всех животных уменьшались амплитуды ранних ответов мышц TA R и MG R, в среднем, на 59,0% и 65,4%, соответственно (Таблица 2).

Амплитуды поздних ответов, также, не изменялись при введении альфа-2<sub>A</sub> и альфа-2<sub>B</sub> антагонистов. При введении JP 1302 у всех кошек наблюдалось достоверное снижение величины ответа мышц MG R, в среднем, на 96,4% и VL R на 88,0% по сравнению с исходным уровнем (Таблица 2).

Таблица 2 – Эффекты введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста на локомоцию и ВП

|            | Механическая стимуляция хвоста   | Эпидуральная стимуляция  | ЭС + пассивное движение передних лап   |
|------------|--|--|--|
| Кинематика | ↓длины переноса коленного сустава  | ↓угла голеностопного сустава в фазу E3   | ↓максимальной длины опоры  |
| EMG        |  | ↑максимальной амплитуды TA R, ↓максимальной амплитуды MG R, ↓максимальной амплитуды VL L, ↓площади под кривой MG L, ↓площади под кривой MG R | ↓максимальной амплитуды MG L, ↓площади под кривой MG L, ↑длительности межпачечного интервала MG L, ↑длительности межпачечного интервала VL L |
| ВП         | ↓ амплитуды ранних ответов TA R, ↓ амплитуды ранних ответов MG R, ↓ амплитуды поздних ответов MG R, ↓ амплитуды поздних ответов VL R |  |  |

#### **Фармакологический скрининг мафедина на модели зебраданио**

Доза мафедина для зебраданио, при которой у тестируемых животных наблюдали достоверные поведенческие изменения в тесте «Новый аквариум» составила 60 мг/л. Мафедин в дозе 60 мг/л в Эксперименте 1 приводил к статистически значимому увеличению

(в 1,3 раза) дистанции, проплытой рыбами, в сравнении с контрольной группой. Также по сравнению с контролем средний угол поворота у группы мафедина был в 1,7 раза ниже. Мафедин вызывал у экспериментальных рыб достоверное увеличение времени нахождения в нижней части бассейна. По сравнению с контролем, у группы мафедина была в 1,4 раза увеличена частота состояния низкой мобильности и в 2,3 раза снижена длительность замирания. Таким образом, доза 60 мг/л была выбрана оптимальной для дальнейшего исследования.

Наиболее важными представляются результаты Эксперимента 2, в котором сравнивались поведенческие показатели рыб 3 экспериментальных групп: контрольной, группы мафедина в дозе 60 мг/л и группы, которой одновременно с мафедином вводился антагонист альфа-2С адренорецепторов JP 1302. В данном эксперименте мафедин в дозе 60 мг/л приводил к статистически значимому увеличению количества ускорений и количества всплывтий по сравнению с контрольной группой, в то время как время нахождения в нижней части танка снижалось по сравнению с контролем. В группе, которая получала мафедин одновременно с JP 1302, количество ускорений было ниже по сравнению с группой мафедина, и эта группа находилась больше времени в нижней части танка по сравнению с рыбами, получавшими мафедин.

В эксперименте 3 7-дневное введение мафедина в дозе 1 мг/л приводило к достоверному увеличению длительности и частоты возникновения состояния высокой мобильности по сравнению с контрольными животными. Выраженность данного эффекта имела дозозависимый характер, так как при увеличении дозы наблюдалось его снижение. Также у группы, получавшей мафедин (1 мг/л) было снижено время низкой мобильности. Повышение дозы до 5 и 10 мг/л приводило к увеличению времени нахождения рыб в нижней части танка.

#### **Изучение механизма нейропротекторного действия производного этаноламина**

Исследования показали, что выключение экспрессии гена TRPC6 приводила к значительному снижению амплитуды нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) с 6 у.е. для контрольной группы до 3 у.е. для группы нейронов с выключенным геном TRPC6. Положительный контроль - гиперфорин (НУР) не способен был восстановить амплитуду нДУВК в отсутствие гена TRPC6 до уровня контроля, хотя вызывал статистически значимое повышение амплитуды нДУВК с 3 у.е. до 4 у.е. Последнее наблюдение объясняется тем, что РНК интерференция не выключает ген полностью, всегда остаются следовые количества таргетного белка, которых вероятно достаточно для того, чтобы НУР мог активировать нДУВК. Эксперименты показали, что ФДЭС также не способен активировать нДУВК в отсутствие TRPC6.

Настоящий эксперимент показал, что бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат является активатором нДУВК нейронального депо-управляемого входа кальция в постсинаптические дендритные шипики нейронов гиппокампа. Это позволяет рассматривать его в качестве перспективного соединения для изучения в качестве нейропротекторного средства, в том числе при травмах головного и спинного мозга.

#### **Исследование влияния мафедина на восстановление двигательных функций после ЧМТ**

В Эксперименте 1 было установлено, что введение мафедина крысам после ЧМТ приводит к достоверному улучшению функции передних и задних лап в тесте «Стимулирование конечностей» на 7-е сутки после травмы. В то же время достоверных различий между активностью 2-х доз испытуемого соединения получено не было (Таблица 3).

Таблица 3 – Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей» (Эксперимент 1)

| Группа | 1-й день | 3-й день | 7-й день |
|--------|----------|----------|----------|
|--------|----------|----------|----------|

|                   |              |                  |                 |
|-------------------|--------------|------------------|-----------------|
| Интактные         | 14 (14; 14)  | 14 (14; 14)      | 14 (14; 14)     |
| Контроль (травма) | 0 (0; 1,5)## | 5 (4; 7)##       | 8 (6; 8)##      |
| Клонидин          | 0,5 (0; 3,5) | 9,5 (7,25; 12)** | 10 (9,5; 12)**  |
| Мафедин 2,5 мг/кг | 0 (0; 4)     | 8 (5; 10)        | 12 (7; 12)*     |
| Мафедин 5 мг/кг   | 2 (0,25; 3)  | 9 (7,5; 9,25)**  | 11 (9,25; 12)** |

Примечание: здесь и в табл. 4-6 - ## -  $p < 0,01$  - достоверные отличия от интактных животных по критерию Крускаля-Уоллиса; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  достоверные отличия от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускаля-Уоллиса.

В тесте ОП мафедин, вводимый в дозе 2,5 мг/кг статистически значимо увеличивал показатель общей двигательной активности (ОДА) ( $p=0,0096$ ) по сравнению с контрольной группой. Важно отметить, что при введении данного средства в дозе 5 мг/кг, положительный эффект не наблюдался. Клонидин не продемонстрировал статистически значимого улучшения показателей ОДА и поисково-исследовательской активности (ПИА) в данном тесте (Таблица 4).

Таблица 4 – ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы

| Группа            | ОДА         | ПИА       |
|-------------------|-------------|-----------|
| Интактные         | 26,4±3,1    | 8,1±1,8   |
| Контроль (травма) | 2,4±1,5##   | 0,4±0,4## |
| Клонидин          | 16,9±3,7    | 2,2±0,8   |
| Мафедин 2,5 мг/кг | 31,9±10,6** | 3,3±1,3   |
| Мафедин 5 мг/кг   | 3,2±1,5     | 0,7±0,7   |

В тесте «Сужающаяся дорожка» как клонидин, так и мафедин в обеих дозах улучшали состояние двигательной функции передней конечности. Мафедин в дозах 2,5 мг/кг и 5 мг/кг в данном тесте также улучшал функцию задней конечности травмированных крыс ( $p=0,0381$  и  $p=0,0205$ , соответственно). Достоверных различий между результатами двух доз мафедина получено не было (Таблица 5).

Таблица 5 – Степень выраженности сенсомоторного дефицита передней (СД-П) и задней (СД-З) контрлатеральных конечностей животных в тесте «Сужающаяся дорожка» на 7 сутки после травмы (Эксперимент 1)

| Группа            | СД-П,%     | СД-З,%     |
|-------------------|------------|------------|
| Интактные         | 1,5±0,5    | 2,7±0,7    |
| Контроль (травма) | 29,2±3,4## | 25,5±4,8## |
| Клонидин          | 8,1±0,8**  | 17,2±1,4   |
| Мафедин 2,5 мг/кг | 9,7±1,5**  | 14,5±2,3*  |
| Мафедин 5 мг/кг   | 8,7±2,1**  | 13,3±2,5*  |

В Эксперименте 2 в тесте «Стимулирование конечностей» йохимбин отменял положительный эффект мафедина в данном тесте на 3-е сутки после травмы ( $p=0,0071$ ) (Рисунок 1).

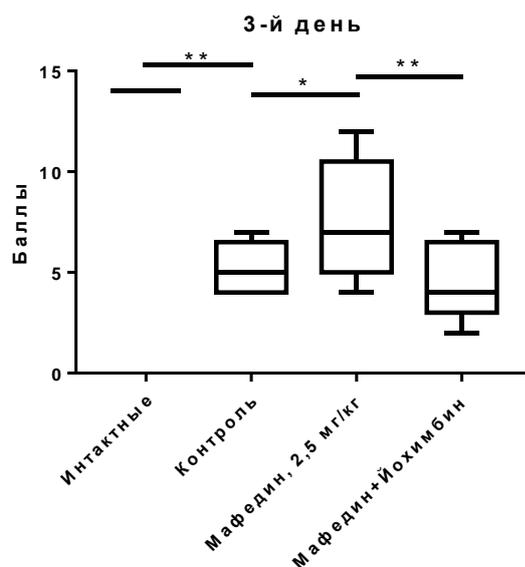


Рисунок 1 – Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей» (Эксперимент 2). \*- достоверное отличие ( $p < 0,05$ ), \*\* - достоверное отличие ( $p < 0,01$ ) от соответствующего контрольного показателя.

В тесте ОП в Эксперименте 2, как и в Эксперименте 1, мафедин увеличивал ОДА у травмированных животных ( $p=0,0158$ ), при этом введение йохимбина в эквимолярных количествах блокировало данный эффект ( $p=0,0012$ ). Мафедин не продемонстрировал статистически значимого увеличения ПИА, однако было получено достоверное отличие между группами мафедина и мафедина с йохимбином ( $p=0,0238$ ) (Рисунок 2).

Таким образом, введение мафедина крысам в дозе 2,5 мг/кг спустя час после ЧМТ и в течение последующих 6 дней приводит к увеличению их общей двигательной активности и улучшению функции передних и задних конечностей без негативного влияния на поведенческие показатели. Йохимбин отменяет большинство положительных эффектов изучаемого соединения, что позволяет говорить о том, что в положительном эффекте последнего принимают участие альфа-2 адренорецепторы.

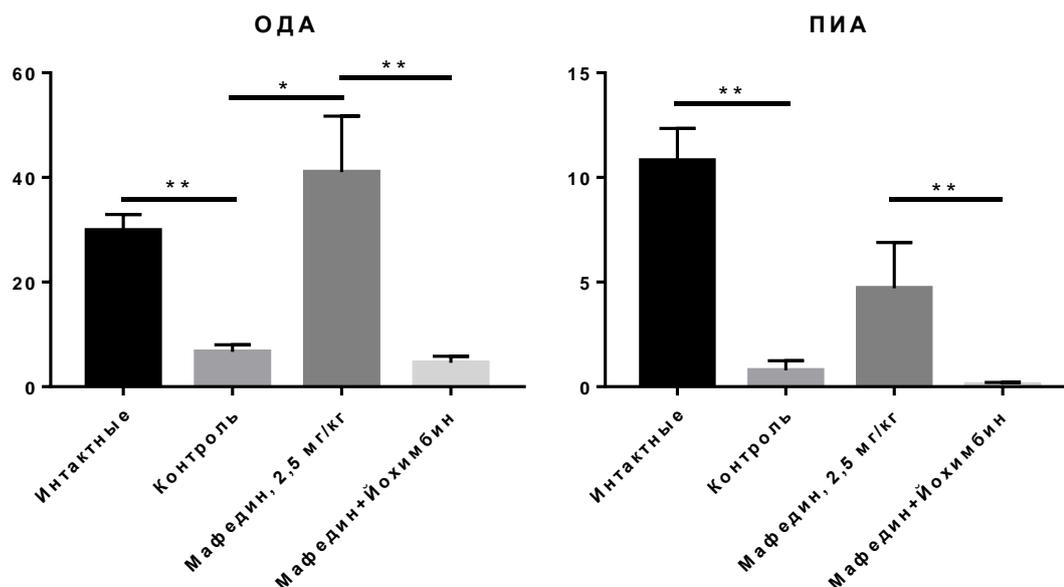


Рисунок 2 – ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы (Эксперимент 2). \*- достоверное отличие ( $p < 0,05$ ), \*\* - достоверное отличие ( $p < 0,01$ ) от соответствующего контрольного показателя.

### Исследование влияния производного этаноламина на восстановление двигательных функций после ЧМТ

В Эксперименте 1 в тесте «Стимулирование конечностей» ФДЭС в дозе 10 мг/кг статистически значимо улучшал состояние двигательной функции передних и задних лап по сравнению с контролем ( $p=0,0070$ ), однако его эффективность не отличалась от таковой цитиколина или холина альфосцерата. В целом, не было получено достоверных различий между эффектами ФДЭС и референсными средствами ни на 3-й, ни на 7-й день после травмы (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей»

| Группа         | 1-й день       | 3-й день          | 7-й день           |
|----------------|----------------|-------------------|--------------------|
| Интактные      | 14 (14; 14)    | 14 (14; 14)       | 14 (14; 14)        |
| Контроль       | 0 (0; 1.5)##   | 5 (4; 7)##        | 8 (6; 8)##         |
| Х. альфосцерат | 2 (0,5; 3)     | 6 (5; 8)          | 9 (8; 12)*         |
| Цитиколин      | 1 (0,75; 2,75) | 8 (7; 10)*        | 11.5 (10,75; 12)** |
| ФДЭС, 75 мг/кг | 0 (0; 2.5)     | 10 (4,75; 10,25)* | 9.5 (7,75; 11)     |
| ФДЭС, 10 мг/кг | 2 (0; 4)       | 8 (7; 9)*         | 10 (8,5; 11,5)**   |

В тесте «Открытое поле» в Эксперименте 1 животные, которым после травмы вводили ФДЭС в дозе 10 мг/кг продемонстрировали большее значение ОДА по сравнению с контрольной группой ( $p=0,0080$ ). При этом статистически значимых различий между группами ФДЭС и другими референсными средствами обнаружено не было (Таблица 7).

Таблица 7 – ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы

| Группа         | ОДА        | ИА        |
|----------------|------------|-----------|
| Интактные      | 24,4±3,8   | 7,3±1,8   |
| Контроль       | 2,4±1,5##  | 0,4±0,4## |
| Х. альфосцерат | 5,1±2,3    | 0,7±0,5   |
| Цитиколин      | 10,1±2,5   | 1,1±0,4   |
| ФДЭС, 75 мг/кг | 13,8±5,6   | 1,1±0,5   |
| ФДЭС, 10 мг/кг | 23,9±5,4** | 1,8±0,4   |

Примечание: ## -  $p<0,01$  - достоверные отличия от интактных животных по критерию Крускаля-Уоллиса; \*\* -  $p<0,01$  достоверные отличия от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускаля-Уоллиса.

В тесте «Сужающаяся дорожка» в Эксперименте 1 ФДЭС в дозах 10 и 75 мг/кг достоверно улучшал функцию передней контрлатеральной конечностей относительно контрольных животных ( $p < 0,0001$  для обеих доз). Также в группе 10 мг/кг было продемонстрировано достоверное улучшение функции задней конечности ( $p=0,0122$ ). Среди референсных средств цитиколин статистически значимо снижал степень двигательного дефицита контрлатеральной передней конечности по сравнению с контролем ( $p < 0,0001$ ) (Таблица 8).

Таблица 8 – Степень выраженности сенсомоторного дефицита передней (СД-П) и задней (СД-З) контрлатеральных конечностей животных в тесте «Сужающаяся дорожка» на 7 сутки после травмы

| Группа         | СД-П,%     | СД-З,%     |
|----------------|------------|------------|
| Интактные      | 1,5±0,5**  | 2,7±0,7**  |
| Контроль       | 29,2±3,4   | 25,5±4,9   |
| Х. альфосцерат | 27,3±2,8   | 41,3±1,4** |
| Цитиколин      | 10,0±2,1** | 26,8±3,9   |

| Группа         | СД-П, %   | СД-З, %   |
|----------------|-----------|-----------|
| Интактные      | 1,5±0,5** | 2,7±0,7** |
| ФДЭС, 75 мг/кг | 8,0±1,5** | 15,0±1,4  |
| ФДЭС, 10 мг/кг | 4,8±0,8** | 12,6±1,8* |

Примечание: \*\* - достоверное отличие ( $p < 0,01$ ) от соответствующего контрольного показателя.

В Эксперименте 2 в тесте «Стимулирование конечностей» скополамин отменял эффекты ФДЭС на 7-е сутки после травмы ( $p=0,0120$ ) (Рисунок 3).

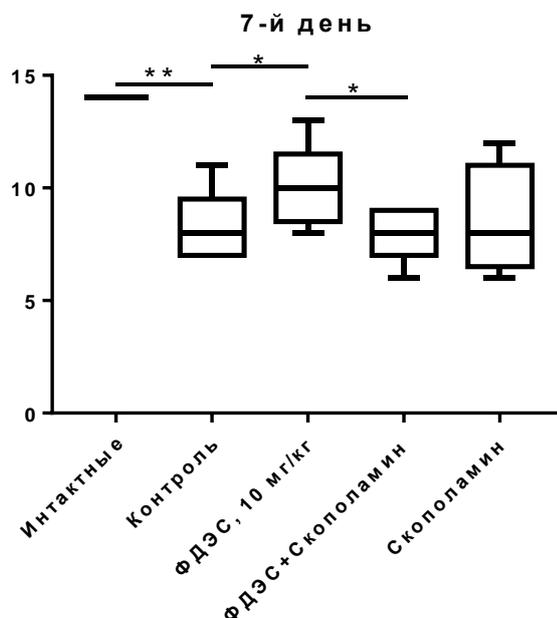


Рисунок 3 – Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей» (Эксперимент 2). \* - достоверное отличие ( $p < 0,05$ ), \*\* - достоверное отличие ( $p < 0,01$ ).

В Эксперименте 2 в тесте «Сужающаяся дорожка» ФДЭС в дозе 10 мг/кг продемонстрировал эффекты, наблюдаемые в Эксперименте 1. Введение скополамина животным после травмы также улучшало состояние двигательной функции передней и задней контрлатеральной конечностей по сравнению с контрольными животными ( $p=0,0024$  и  $p < 0,0001$ , соответственно). Одновременное введение ФДЭС и скополамина снижало положительный эффект обоих средств (Рисунок 4).

В целом, применение нового производного диэтиламиноэтанола в дозе 10 мг/кг у животных после черепно-мозговой травмы позволило достичь улучшения состояния моторной функции передней и задней конечностей, расположенных контрлатерально к месту повреждения, а также к увеличению показателей общей двигательной (ОДА) и поисково-исследовательской активности (ПИА). Поскольку скополамин отменяет большинство положительных эффектов производного этаноламина, можно говорить о том, что в положительном эффекте последнего принимает участие холинергическая система.

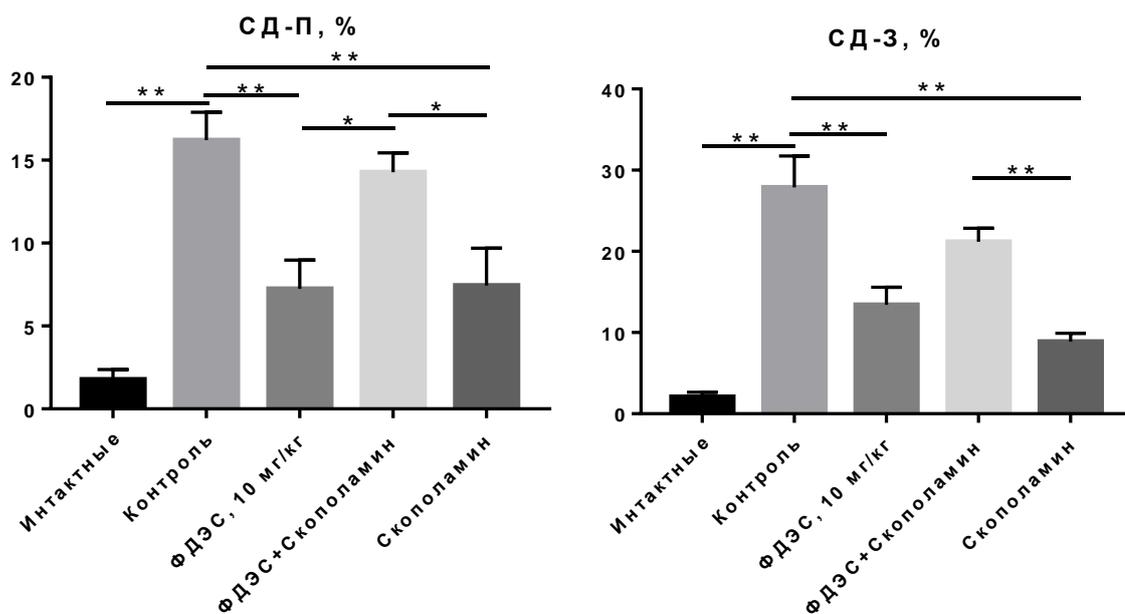


Рисунок 4 – Степень выраженности сенсомоторного дефицита передней (СД-П) и задней (СД-З) контралатеральных конечностей животных в тесте «Сужающаяся дорожка» на 7 сутки после травмы (Эксперимент 2). \*- достоверное отличие ( $p < 0,05$ ), \*\* - достоверное отличие ( $p < 0,01$ ).

#### Морфологический анализ очага повреждения головного мозга у крыс после ЧМТ

Морфометрический анализ показал, что на 7-е сутки после недельного введения мафедина в дозе 2,5 мг/кг крысам, перенесшим ЧМТ, у данных животных объем повреждения головного мозга в 1,6 раза меньше по сравнению с контрольной группой. Введение ФДЭС 10 мг/кг, цитиколина или клонидина в течение недели не приводило к статистически значимому уменьшению повреждения (Таблица 9).

Таблица 9 – Объем повреждения головного мозга крыс на 7-й день после травмы

| Группа            | Объем повреждения, мм <sup>3</sup> |
|-------------------|------------------------------------|
| Контроль          | 51,9±5,8                           |
| Цитиколин         | 41,4±7,6                           |
| ФДЭС 10 мг/кг     | 43,5±5,4                           |
| Клонидин          | 48,0±10,8                          |
| Мафедин 2,5 мг/кг | 33,2±5,4*                          |

Примечание: \* - достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем по критерию Крускаля-Уоллиса.

При гистологическом исследовании в ткани мозга крыс после травмы был отчетливо виден очаг повреждения ткани мозга, где на большом протяжении структуры коры и белого вещества не определяются, видны небольшие свободные пространства, но в основном разрушенная ткань замещена зернистыми шарами – макрофагами, утилизирующими разрушенную ткань мозга. В не травмированном полушарии наблюдались реактивные изменения, проявлявшиеся в основном в значительном расширении периваскулярных пространств при сохранении цитоархитектоники коры. У животных, получавших в качестве лечения мафедин в дозе 2,5 мг/кг, очаг некроза также определяется, были видны небольшие полости, мелкие кровоизлияния и небольшие участки ткани, лишенные клеток. Но, в отличие от животных контрольной группы, в этом случае зернистые шары практически отсутствовали, а количество глиальных клеток и тканевых макрофагов в некоторых участках не только не увеличивалось, но даже уменьшалось.

## ВЫВОДЫ

1) Альфа-2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub> и 2<sub>C</sub> адренорецепторы участвуют в модуляции кинематических и миографических параметров локомоции, а также рефлекторных вызванных потенциалов в мышцах задних конечностей. Двигательные эффекты селективных антагонистов данных рецепторов определяются их распределением в нейронных сетях спинного мозга и зависят от механизмов, изначально инициирующих шагательные движения: стимуляции спинного мозга, сенсорных путей и проприоспинальных связей.

2) Ключевую роль в нейроконтроле локомоции играют альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторы. Их блокада приводит к ухудшению ходьбы по ряду кинематических параметров, снижению активности мышц-экстензоров, а также уменьшению амплитуды рефлекторных мышечных ответов при эпидуральной стимуляции спинного мозга.

3) Мафедин является агонистом центральных альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов. На модели зебраданио введение мафедина в дозе 60 мг/л приводит к достоверным изменениям двигательных поведенческих параметров животных в тесте «Новый аквариум», устраняемым избирательным антагонистом альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов.

4) За счет активации TRPC6-зависимого нДУВК ФДЭС демонстрирует нейропротекторные свойства в первичной гиппокампальной культуре. Нейропротекторный эффект изучаемого соединения заключается в способности защищать грибовидные шипики от повреждения, тем самым стабилизируя и усиливая синаптическую передачу, при этом его рабочие концентрации находятся в наномолярном диапазоне.

5) Введение мафедина крысам после черепно-мозговой травмы способствует снижению неврологического дефицита, увеличению общей двигательной активности и нормализации моторно-координационной функции контралатеральных передних и задних конечностей. Данное соединение позволяет достичь уменьшения объема повреждения головного мозга, а также снижения интенсивности воспалительного процесса в очаге повреждения. Наибольшая нейрореабилитационная активность мафедина наблюдается в дозе 2,5 мг/кг, и сопоставима с таковой клонидина в дозе 40 мкг/кг.

6) ФДЭС способствует снижению неврологического дефицита и улучшению ориентировочно-исследовательского поведения у крыс на фоне черепно-мозговой травмы. Наибольшая эффективность нового соединения наблюдается при его введении в дозе 10 мг/кг. Нейропротекторная активность ФДЭС в этой дозе сопоставима с таковой цитиколина в дозе 500 мг/кг. Положительный эффект соединения реализуется за счет холинергических механизмов, поскольку скополамин в эквимолярных количествах отменяет действие ФДЭС.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Модель ККУ может быть использована в экспериментальной фармакологии для изучения лекарственных средств с нейропротекторным действием. Наиболее оптимальными временными точками для проведения поведенческих и функциональных тестов у крыс являются: 1-е, 3-е и 7-е сутки после травмы.

Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандионат и 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (мафедин) можно рекомендовать для проведения расширенных доклинических исследований.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. **Сысоев, Ю.И.** Влияние адренергических и холинергических средств на восстановление двигательных функций при поражении ЦНС / **Ю.И. Сысоев, П.Е. Мусиенко, С.В. Оковитый** // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80. – № 7. – С. 37-44.

2. **Сысоев, Ю.И.** Влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы / **Ю.И. Сысоев, С.В. Оковитый, Б.Ч. Узугбунам** // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 95-105.

3. **Сысоев, Ю.И.** Производные этаноламина как нейропротекторные средства / **Ю.И. Сысоев, И.А. Титович, С.В. Оковитый, Б.Ю. Лалаев, В.Ц. Болотова, А.Н. Кимаев, Е.В. Загладкина** // Фармация. – 2019. – Т.68. – № 1. – С. 48-55.

4. **Сысоев, Ю.И.** Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс / **Ю.И. Сысоев, С.Г. Дагаев, Л.Г. Кубарская, О.Н. Гайкова, Б.Ч. Узугбунам, К. Модисе, Л.Т. Маквана, С.В. Оковитый** // Биомедицина. – Т. 15. – № 1. – С. 62-77.

5. **Сысоев, Ю.И.** Механизм действия нового производного этаноламина - бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата / **Ю.И. Сысоев, Е.А. Попугаева, Д.П. Чернюк, И.А. Титович, Е.В. Загладкина, В.Ц. Болотова, И.Б. Безпрозванный, С.В. Оковитый** // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т.82 – № 4. – С. 37-44.

### Патенты

1. Пат. 2669555 Российская Федерация, С07D 239/54 А61Р 27/00 А61Р 9/12. 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (мафедин) и способ его получения / Юсковец В.Н., Чернов Н.М., Яковлев И.П., Оковитый С.В., **Сысоев Ю.И.**, Анисимова Н.А.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России – № 2669555, заявл. 19.01.18; опубл. 12.10.18, Бюл. №29. – 8 с.

2. Пат. 2675694 Российская Федерация, МПК А61К 31/513 А61Р 25/00. Нейрореабилитационное средство на основе 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия / **Сысоев Ю.И.**, Оковитый С.В., Анисимова Н.А., Яковлев И.П., Чернов Н.М.; заявители и патентообладатели ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России – № 2675694, заявл.19.01.18; опубл. 24.12.18, Бюл. №36. – 9 с.

### Статьи в иных журналах и сборниках материалов конференции

1. **Сысоев, Ю.И.** Влияние препаратов с адрено- и холиномиметическим действием на восстановление двигательных функций после различных повреждений ЦНС / **Ю.И. Сысоев** // Сборник материалов конференции "Инновации в здоровье нации сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием". – г. Санкт-Петербург, Россия. – 2015. – С. 138-141.

2. **Сысоев, Ю.И.** Препараты с дофаминергическим, адренергическим и холинергическим действием в лечение последствий черепно-мозговой травмы / **Ю.И. Сысоев** // Сборник материалов конференции «Инновации в здоровье нации сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием». – г. Санкт-Петербург, Россия. – 2016. – С. 176-182.

3. Модисе, К. Влияние 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия на двигательные функции передних и задних конечностей у крыс после черепно-мозговой травмы / К. Модисе, Л.Т. Маквана, **Ю.И. Сысоев** // Сборник VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – г. Санкт-Петербург, Россия. – 2018. – С. 96-100.

4. Маквана, Л.Т. Влияние 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олята натрия на поведение крыс после черепно-мозговой травмы / Л.Т. Маквана, К. Модисе, **Ю.И. Сысоев** // Сборник VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – г. Санкт-Петербург. – 2018. – С. 85-89.

5. **Sysoev, Y.I.** Pharmacological screening of mafedine, a novel alpha-2 adrenoreceptor agonist, in zebrafish / **Y.I. Sysoev, D.A. Meshalkina, S.V. Okovityi, P.E. Musienko, A.V. Kalueff**

// 25<sup>th</sup> international «Stress and behavior» Neuroscience and Biopsychiatry Conference. – St-Petersburg, Russia. – 2018. – P. 53-54.

6. **Sysoev, Y.I.** Effects of chronic mafedine exposure in zebrafish. **Y.I. Sysoev, D.A. Meshalkina, D.V. Petrov, S.V. Okovityi, P.E. Musienko, A.V. Kalueff** // 14<sup>th</sup> international «Stress and behavior» Neuroscience and Biopsychiatry Conference (North America). – Miami Beach, FL, USA. – 2018. – P. 19.

7. **Сысоев, Ю.И.** Эффективность использования нового агониста альфа-2 адренорецепторов в острый период черепно-мозговой травмы у крыс / **Ю.И. Сысоев, С.В. Оковитый** // V съезд фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств" (Материалы съезда), серия Экспериментальная и клиническая фармакология. – г. Ярославль, Россия. – 2018. – С.237-238.

8. **Сысоев, Ю.И.** Моделирование черепно-мозговых травм у лабораторных животных в нейрофармакологии / **Ю.И. Сысоев, С.В. Оковитый** // Вестник образования и развития Российской академии естественных наук. – 2018. – №3. – С. 66-73.

9. **Sysoev, Y.I.** Pharmacological screening of a new alpha-2 adrenoreceptor agonist, mafedine, in zebrafish / **Y.I. Sysoev, D.A. Meshalkina, D.V. Petrov, S.V. Okovityi, P.E. Musienko, A.V. Kalueff** // Neuroscience letters. – 2019. – № 701. – P. 234-239.

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

**ВП** – вызванные потенциалы

**ККУ** – контролируемый кортикальный ушиб

**НА** – «Новый аквариум» тест

**нДУВК** – нейрональный депо-управляемый вход кальция

**ОДА** – общая двигательная активность

**ПИА** – поисково-исследовательская активность

**ПКЛ** – приподнятый крестообразный лабиринт

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

бутандиоат

**ЧМТ** – черепно-мозговая травма

**ЭС** – эпидуральная стимуляция