

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

На правах рукописи

СЫСОЕВ ЮРИЙ ИГОРЕВИЧ

«ВЛИЯНИЕ АДРЕНОТРОПНЫХ И ХОЛИНОТРОПНЫХ СРЕДСТВ НА  
ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ ПРИ ПОРАЖЕНИИ  
ЦНС»

(экспериментальное исследование)

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология  
03.03.01 Физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор  
Оковитый Сергей Владимирович

Доктор медицинских наук  
Мусяенко Павел Евгеньевич

Санкт-Петербург

2019 г.

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 Альфа-2 адрено- и холинорецепторы в контроле двигательной активности.....	15
1.1.1 Локализация и функции альфа-2 адренорецепторов в головном и спинном мозге.....	15
1.1.2 Локализация и функции холинорецепторов в головном и спинном мозге.....	17
1.2. Патогенез черепно-мозговой травмы	
1.2.1 Механизмы повреждения нейронов при черепно-мозговой травме.....	23
1.2.2 Нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера и белковый состав спинномозговой жидкости после черепно-мозговой травмы.....	28
1.3 Нарушения функций контроля движений в ЦНС при черепно-мозговой травме.....	29
1.4 Фармакологическая коррекция последствий черепно-мозговой травмы.....	33
1.4.1 Агонисты альфа-2 адренорецепторов как нейропротекторные/нейрореабилитационные средства.....	34
1.4.2 Производные этаноламина как нейропротекторные/нейрореабилитационные средства.....	41
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
Фармакологические исследования функций различных подтипов альфа-2 адренорецепторов на модели децеребрированной кошки.....	49
Использование модели зебраданио в тесте «Новый аквариум».....	53
Исследуемые вещества.....	56
Изучение механизма нейропротекторного действия производного этаноламина.....	56

Моделирование черепно-мозговой травмы у крыс методом контролируемого кортикального ушиба.....	60
Тест «Стимулирование конечностей».....	62
Тест «Цилиндр».....	63
Тест «Сужающаяся дорожка».....	63
Тест Монтойа.....	64
Тест «Открытое поле».....	65
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт».....	65
Временные точки тестирования.....	65
Морфологический анализ очага повреждения головного мозга травмированных крыс травмы.....	68
Изучение белкового состава спинномозговой жидкости травмированных крыс.....	68
Статистическая обработка данных.....	69
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1 Изучение роли подтипов альфа-2 адренорецепторов в нейроконтроле локомоции децеребрированной кошки	
3.1.1. Влияние селективных антагонистов альфа-2 адренорецепторов на параметры кинематики при различных видах локомоции.....	71
3.1.2 Влияние селективных антагонистов альфа-2 адренорецепторов на параметры миограмм мышц задних и передних конечностей при различных видах локомоции.....	78
3.1.3 Влияние антагонистов альфа-2 адренорецепторов на величину амплитуды ответов мышц задних и передних конечностей при эпидуральной стимуляции спинного мозга.....	87
3.2 Изучение механизма действия мафедина.....	96
3.3 Изучение механизма действия ФДЭС.....	122
3.4. Оценка эффективности изучаемых соединений на модели ЧМТ.....	130
3.4.1 Исследование эффективности мафедина.....	131
3.4.2 Исследование эффективности производного этаноламина.....	136

3.4.3 Морфологический анализ очага повреждения головного мозга у крыс после ЧМТ.....	143
3.4.4 Влияние изучаемых соединений на белковый состав спинномозговой жидкости крыс после ЧМТ.....	146
ВЫВОДЫ.....	158
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	161

## ВВЕДЕНИЕ

### 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.

Структуры, обеспечивающие регуляцию позы и движения (двигательные центры), распределены по всей центральной нервной системе – от коры больших полушарий до спинного мозга. Подкорковые и корковые мотивационные зоны, ассоциативная и сенсорная области коры, премоторная и дополнительная двигательная области, стволовые двигательные центры, а также спинальные сети находятся в иерархическом порядке, который является результатом эволюционной адаптации двигательной системы к выполнению все более сложных задач. В то же время центры регуляции двигательной активности не только составляют элементы иерархической системы, но одновременно действуют в кооперации друг с другом (Bernstein, N. A., 1967).

Супраспинальные центры действуют на нейронные сети спинного мозга через нисходящие аксоны, которые, достигая спинального уровня, оказывают влияние 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).

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является актуальной медико-социальной и экономической проблемой для всех развитых стран, затрагивающей более 10 млн. человек ежегодно. Также, она связана с высокими показателями летальности, стойкой нетрудоспособностью, инвалидизацией наиболее социально активной части общества. В Российской Федерации летальность в результате ЧМТ занимает

второе место среди всех причин и составляет при тяжелой степени тяжести 60% и более, а среди причин развития инвалидизации ЧМТ занимает первое место. Огромны и экономические потери в связи с временной или стойкой утратой трудоспособности у пострадавших с ЧМТ. Например, в США ежегодные расходы, которые включают в себя потерю потенциального дохода пациента и родственников, стоимость неотложной помощи, а также другие медицинские расходы, такие как постоянный амбулаторный уход и реабилитация, оценивают в среднем в 4 млрд. долларов (Amcheslavsky, V. G., 2016). Последствиями черепно-мозговых травм являются когнитивные нарушения, эмоционально-поведенческие расстройства, астения и, что особенно важно с точки зрения качества жизни – двигательные расстройства.

Фармакотерапия двигательных расстройств может осуществляться двумя путями. 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 повреждения ЦНС (Chau, C., 1998a, 1998b; Musienko, P., 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 (Jellish, W. S., 2005; Yanli, L., 2016; Zhang, Y., 2004). 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). Другой альфа-2 адреномиметик -

тизанидин показал эффективность в терапии спастичности у пациентов, перенесших черепно-мозговую травму (Meuthaler, J. M., 2001).

Холинотропные средства традиционно применяются в терапии нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера (Jacobson, S. A., 2008), коррекции последствий ишемического инсульта (Barrett, K. M., 2011), а также черепно-мозговой травмы (Griffin, S. L., 2003; Khateb, A., 2005; Tenovuo, O. S., 2006). К холинотропным средствам относятся соединения, оказывающие как прямое действие на М- и Н-холинорецепторы, так и препараты, увеличивающие количество ацетилхолина в пределах ЦНС за счет, например, ингибирования ацетилхолинэстеразы (донепезил) или же, являясь субстратами для синтеза, они могут химически преобразовываться в холин или ацетилхолин (холина альфосцерат, цитиколин, деанола ацеглумат). Производные этаноламина и его солей активно изучаются начиная с 60-70-х годов прошлого века. 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 разработанности темы исследования

Физиологическая роль подтипов альфа-2 адренорецепторов неоднократно изучалась с использованием различных экспериментальных моделей. Так, было показано, что активация альфа-2<sub>A</sub> АР ростральной вентролатеральной области продолговатого мозга у мышей вызывает гипотензию (MacMillan, L. B., 1996), а голубого пятна (*locus coeruleus*) – седацию (Kable, J. W., 2000). Как показали эксперименты с использованием нокаутных животных, через альфа-2<sub>A</sub> АР 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 АР. Например, в то время как альфа-2<sub>B</sub> АР 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, C., 1998b), однако на сегодняшний день роль подтипов альфа-2 адренорецепторов в регуляции локомоторной функции плохо изучена.

В серии исследований мафедин, 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, захватывается нейронами и клетками нейроглии, и непосредственно в нейронах метилируется до холина, включающегося в синтез ацетилхолина – одного из основных нейромедиаторов, участвующих в процессах обучения и памяти (Kewitz, H., 1976). Даже незначительного добавочного количества холина достаточно для насыщения процесса образования ацетилхолина, а его избыток может использоваться для синтеза фосфолипидов (Haubrich, D. R., 1975). В то же время, некоторые авторы предполагают, что для производных этаноламина прекурсорный холиномиметический эффект не является ведущим. Например, в исследова-



нии Weineret W. J. et al., проведённом на морских свинках, которым предварительно вводился амфетамин (предполагается, что средства, обладающие холиномиметическим действием, способны снижать выраженность амфетамин-индуцированного стереотипного поведения), он не продемонстрировал центрального холиномиметического действия (Weiner, W. J., 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).

#### Соответствие исследований государственным и ведомственным программам

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

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

Исследование также было поддержано грантом Российского Научного Фонда (РНФ грант №14-15-00788) «Исследование супраспинальных и спинальных механизмов соматосенсорной регуляции направления локомоторных движений у животных и человека» и грантом Фонда содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере на работу «Изыскание препарата

с адренотропным действием для восстановления двигательных функций после различных повреждений ЦНС» по договору 10826ГУ/2016.

### Цель диссертационной работы

Оценка возможности использования средств с адренотропным (6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропири-мидин-4-олят натрия (мафедин)) и холинотропным (бис{2-((2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси)-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат (ФДЭС)) действием для коррекции двигательных функций при травматическом повреждении ЦНС.

### Задачи исследования

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 исследования

В работе впервые показана роль различных подтипов альфа-2 адренорецепторов в механизмах регуляции локомоторной функции. На модели децеребрированной 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 мафедин является агонистом альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов и его эффекты на двигательные-поведенческие параметры связаны с активацией именно этого подтипа альфа-2 адренорецепторов.

Установлено, что механизмом действия бис{2-((2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси)-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат (ФДЭС) является активация нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) в постсинаптические дендритные шипики. В отсутствие каналов TRPC6 (основных регуляторов нДУВК в гиппокампе) исследуемое вещество не активировало вход кальция в нейронах гиппокампа, что свидетельствует о специфичности его действия именно на нДУВК.

Оценено влияние 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) на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы, вызванной методом «контролируемого кортикального удара». Показано, что 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. Поскольку йохимбин отменяет большинство положительных эффекты изучаемого соединения, это позволяет говорить о том, что в положительном эффекте последнего принимают участие 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). Поскольку скопамин отменяет большинство положительных эффектов производного этанола-

мина, можно говорить о том, что в положительном эффекте последнего принимает участие холинергическая система.

Проведенные исследования показали, что мафедин, вводимый крысам в течение 7 дней после ЧМТ уменьшает у экспериментальных животных объем повреждения головного мозга, а также интенсивность воспалительных процессов в очаге травмы.

Введение производного этаноламина уменьшало количество белков массой 69-85 кДа, кроме того, наблюдалась тенденция к уменьшению фракций 60 и 61 кДа, т.е. в целом, уменьшается количество белков в СМЖ, которые являются показателями травмы, что свидетельствует о том, что ФДЭС способен нормализовать нарушенную барьерную функцию 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 потенциального корректора двигательных нарушений после перенесенных травм ЦНС. ФДЭС может быть рекомендован к использованию в острый период черепно-мозговых травм, как средство, способное снижать выраженность двигательных нарушений. Аналогичным образом может быть рекомендован к использованию в неврологической практике и мафедин. Кроме того, мафедин может быть рекомендован к использованию и не только в острый период, но также и спустя длительное время после перенесенной травмы головного или спинного мозга, так как положительный эффект данного соединения может реализовываться не только за счет нейропротекторного действия, но и за счет модуляции спинально-стволовых рефлексов, необходимых для генерации нормальных шагательных движений.

Изучение роли подтипов альфа-2 адренорецепторов в регуляции локомоции, а также эффектов мафедина и ФДЭС на течение исхода черепно-мозговой травмы

позволяет вести целенаправленный поиск эффективных лекарственных средств для коррекции последствий нейротравм.

#### 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).

#### Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов

Автор лично участвовал в планировании и постановке экспериментов, обработке и интерпретации получаемых данных, подготовке публикаций по результатам выполненной работы.

#### 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» и №2675694 «Нейрореабилитационное средство на основе «6-Оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия».

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Альфа-2 адренергические и холинергические рецепторы в контроле двигательной активности

#### 1.1.1 Локализация и функции альфа-2 адренорецепторов в головном и спинном мозге

Подтипы альфа-2 адренорецепторов распределены в мозге млекопитающих сходным образом. Например, сравнение крыс и обезьян не обнаружило межвидовых различий в региональном распределении рецепторов альфа-2 подтипа. Значительное количество мРНК этого подтипа наиболее широко экспрессируемого в мозге среди альфа-2 адренорецепторов обнаружены в синем пятне и других ядрах ствола мозга, содержащих тела норадренергических нейронов, а также в коре, перегородке, гипоталамусе, гиппокампе и миндалине (Дыгало, Н. Н., 2001).

А-подтип альфа-2 адренорецепторов раньше других начинает экспрессироваться в онтогенезе. У мышей его мРНК впервые выявляется в нервной ткани на 10 день эмбриогенеза одновременно с катехоламинами. Такое раннее появление альфа-2<sub>A</sub> АР в мозге послужило основанием для предположения об их участии в процессах миграции, дифференцировки и созревания нейронов. У крыс присутствие мРНК альфа-2<sub>A</sub> АР регистрируется на 14 день эмбриогенеза в ряде областей, прилежащих к зародышевым зонам переднего и заднего мозга, а также в центральных норадренергических нейронах. В последующие сроки пренатального онтогенеза отмечается рост экспрессии мРНК рецепторов, коррелирующий с увеличением количества рецепторных белков. В постнатальном онтогенезе в переднем мозге отмечается дальнейшее увеличение числа рецепторов, которое повышается примерно в 4 раза, достигая уровня взрослых животных к 28-му дню жизни крыс. В заднем мозге, напротив, после рождения отмечается резкое снижение плотности альфа-2<sub>A</sub> АР (Дыгало, Н. Н., 2001).

Активация альфа-2<sub>A</sub> АР роstralной 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> АР реализуются также антиноцицептивный и гипотермический эффекты альфа-2 адреномиметиков, таких как дексмететомидин (Hunter, J. C., 1997).

Матричная РНК другого подтипа альфа-2 АР – альфа 2<sub>C</sub> – в наибольших количествах обнаруживается в базальных ганглиях, зрительных буграх, гиппокампе и коре, впервые выявлена в онтогенезе мышей на 15 день эмбриогенеза (Дыгало, Н. Н., 2001).

Транскрипт гена альфа-2<sub>B</sub>-подтипа АР в ряде работ был найден только в промежуточном мозге в таламусе. Другим авторам удалось выявить экспрессию мРНК альфа-2<sub>B</sub> АР в мозге крысы только в стриатуме, перегородке, клетках Пуркинье мозжечка. В большинстве областей, проявляющих экспрессию мРНК альфа-2<sub>B</sub> АР, она начинается во время позднего эмбриогенеза, за исключением таламуса, где экспрессия начинается в конце первой недели жизни (Дыгало, Н. Н., 2001).

Относительно мало известно о физиологической роли альфа-2<sub>B</sub> и альфа-2<sub>C</sub> подтипов АР. Например, в то время как альфа-2<sub>B</sub> АР 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).

Количественное сравнение распределения подтипов альфа-2 АР в головном мозге показывает значительное преобладание альфа-2<sub>A</sub>-подтипа. Например, в стриатуме 72% альфа-2<sub>A</sub> и 28% альфа-2<sub>C</sub> АР, а в коре мозга – 90% рецепторов альфа-2<sub>A</sub> и альфа-2<sub>C</sub> подтипа. Преимущественные места субклеточной локализации также неодинаковы у этих подтипов. Иммунофлюо-



ресцентным методом установлено, что основным местом локализации альфа-2<sub>A</sub>-подтипа являются отростки нейронов. В-подтип альфа-2 АР равномерно распределен в плазматической мембране, а наибольшая концентрация С-подтип-специфической метки выявляется внутри клетки в околоядерном пространстве (Дыгало, Н. Н., 2001).

В пределах спинного мозга альфа-2 АР также имеют различную локализацию. У крыс альфа-2 АР найдены, преимущественно, в дорсальных рогах, желатинозной субстанции, а также в промежуточной зоне, расположенной рядом с центральным каналом (Roudet, С., 1994).

Значительное число спинальных нейронов грудного и поясничного отдела, участвующих в локомоции, иннервируются (или находятся в непосредственной близости от них) норадренергическими волокнами и имеют альфа-2<sub>B</sub> АР (Noga, В. R., 2011).

### 1.2.2 Локализация и функции холинорецепторов в головном и спинном мозге

В 2000 году на модели децеребрированной кошки иммуногистохимическим методом были выявлены холинергические нейроны промежуточного серого вещества поясничного отдела спинного мозга, активные во время фиктивной локомоции. Было показано, что эти клетки активны в фазу ипсилатеральной экстензии, а их аксоны проецируются к контралатеральной стороне спинного мозга (Huang, А., 2000).

Считается, что в системе ствола мозга ацетилхолин является медиатором, инициирующим локомоцию (Jordan, L. M., 2014). Он также важен на спинальном уровне, поскольку холинергические проприоспинальные клетки могут быть вовлечены в контроль спинального локомоторного генератора (СЛГ), представляющего собой интернейронные сети в пределах спинного мозга (Huang, А., 2011; Tillakaratne, N. J., 2014). У позвоночных даже после полной перерезки спинного мозга СЛГ инициирует генерацию шагательных

движений структурами, находящимися каудальнее места перерезки (Rossignol, S., 2011). Результаты ряда исследований дают основания полагать, что СЛГ имеется и у человека (Bussel, B., 1989).

У крыс ацетилхолин модулирует обработку спинальных сенсорных сигналов в дорсальных рогах спинного мозга, которые представляют собой основное место объединения спинальной сенсорной информации (Myslinski, N. R., 1977).

У черепах ритмическая активность мотонейронов может быть индуцирована мускарином, и этот эффект зависит от усиления тока в кальциевых каналах L-типа (Perrier, J. F., 2000). В изолированном спинном мозге эмбрионов мышей холинергическая положительная обратная связь от мотонейронов важна для генерации спонтанной ритмической активности (Hanson, M. G., 2003). Применение ацетилхолина на модели изолированного спинного мозга новорожденной крысы индуцировало или облегчало возникновение ритмической активности мотонейронов (Jordan, L. M., 2014; Kiehn, O., 1996).

В дополнение к уже известным холинергическим соматическим мотонейронам выявлено несколько групп интернейронов головного мозга, одна из которых расположена рядом с мезэнцефалической локомоторной областью (МЛО). Возможно, эти холинергические интернейроны обеспечивают главный сигнал МЛО по отношению к ретикулярной формации. Данная гипотеза подтверждается тем, что стимуляция МЛО вызывает возбуждение ретикуло-спинальных нейронов, а их активация ацетилхолином может индуцировать локомоторную активность (Quinlan, K. A., 2004).

Учитывая важную роль холинорецепторов в регуляции локомоции, восстановление двигательной активности потенциально может быть ускорено ингибиторами ацетилхолинэстеразы. В литературе встречаются примеры хорошо координированных локомоторно-подобных движений, вызванных ингибиторами ацетилхолинэстеразы, которые увеличивают выброс ацетилхолина из внутренних холинергических нейронов (Smith, J. C., 1987).

У пациентов, перенесших инсульт, продемонстрированы лучшие результаты в группе, принимавшей ингибитор АХЭ донепезил, по сравнению с контрольной, при выполнении теста двигательной функции Вольфа. Результаты клинических исследований (IIa фаза) продемонстрировали, что около половины пациентов, получавших препарат, показали более полное восстановление двигательной активности по истечении 90 дней терапии (Beristain, X., 2015).

Об участии Н-холинорецепторов в развитии многих заболеваний нервной системы человека хорошо известно (Paterson, D., 2000). Так, например, моторная дисфункция, проявляющаяся в ригидности мышц, треморе и трудностях в иницировании устойчивых движений при болезни Паркинсона, может быть уменьшена после введения никотина (Kelton, M. C., 2000). У пациентов, страдающих данным заболеванием, определяется сниженный уровень дофамина в полосатом теле, что вызвано дегенерацией нейронов в участке черной субстанции (*pars compacta*), чья функция заключается в поставке дофамина полосатому телу. Положительный эффект от введения никотина обусловлен, по-видимому, увеличением содержания дофамина в синапсах черной субстанции (Lichtensteiger, W., 1982) и мезолимбической системы (Kita, T., 1992), а также, видимо, угнетением моноаминоксидазы типа В (Mihailescu, S., 1998). Также обнаружено, что курящие люди имеют более низкую частоту заболеваемости болезнью Паркинсона (примерно в 2 раза), по сравнению с некурящими (Baron, J. A., 1986).

Н-ХР детально изучены в мышцах и, в меньшей степени, нейронах вегетативной нервной системы (Sharples, C. G., 2000). По-видимому, Н-ХР не участвуют в локомоции, так как в экспериментах селективный антагонист Н-ХР тубокурарин не оказывал эффекта на локомоцию, индуцированную ингибитором ацетилхолинэстеразы эдрофонием (Jordan, L. M., 2014).

Никотин обладает определенными нейропротекторными эффектами в ЦНС, включая замедление процессов старения и защиту от гибели nigростриальных нейронов (Marin, P., 1994; Prasad, C., 1994). Оно опосреду-

ется несколькими механизмами, в числе которых увеличение экспрессии нейротрофических факторов (Freedman, R., 1993), ингибирование продукции оксида азота (Shimohama, S., 1996) и активация протеинкиназы C (Li, Y., 1999).

В связи с недостатком лигандов, обладающих высокой степенью избирательности к определенным подтипам рецепторов, а также с тем, что большинство тканей или клеток обладают двумя или более типами М-ХР, определение физиологической и патофизиологической роли отдельных М-ХР представляет собой сложную задачу. Чтобы преодолеть эти сложности, разработаны специальные методики получения мутантных линий мышей с дефицитом того или иного подтипа из 5 известных М-ХР. Проведенные тесты показали, что каждая из пород мутантных мышей обладает физиологическими, поведенческими, биохимическими или нейрохимическими нарушениями (Wess, J., 2004).

Очевидно, М-ХР необходимы для локомоции, вызванной эдрофонией, так как неселективный М-холиноблокатор атропин на этом фоне снижает амплитуду импульсов на электронейрограмме, а также при определенных концентрациях блокирует локомоторную активность (Jordan, L. M., 2014; Smith, J. C., 1987).

Во всех поведенческих тестах у мышей с отсутствием гена М<sub>1</sub>-ХР обнаружено явное увеличение локомоторной активности (Miyakawa, T., 2001). Гиперактивность этой породы связана со значительным ростом (приблизительно 2-кратным) внеклеточной концентрации дофамина в полосатом теле, возможно, из-за большего выброса этого медиатора. По-видимому, недостаток М<sub>1</sub>-ХР на ингибирующих нейронах полосатого тела, идущих к дофаминсодержащим нейронам черной субстанции, приводит к наблюдаемому переизбытку дофамина (Gerber, D. J., 2001).

У новорожденных крыс М<sub>1</sub>-холиноблокатор телензепин блокировал эдрофоний-индуцированную локомоцию только при достаточно высоких концентрациях. Во всех экспериментах, где телензепин вызывал блок локомо-

ции, амплитуды импульсов электронейрограмм были снижены, но частота шагов значительно не изменялась. Необходимость использования больших доз телензепина для блокады локомоции дает основание утверждать, что эффект препарата опосредован неспецифическим действием на  $M_1$ -ХР, а, скорее всего, тем, что он имеет определенный аффинитет к  $M_2$ -ХР, найденным на холинергических проприоспинальных клетках и на мотонейронах. Кроме того, не исключена связывания телензепина в высоких концентрациях с  $M_3$ -ХР. Очевидно, телензепин действует не на элементы центрального локомоторного генератора, ответственные за возникновение локомоторного ритма, а на клетки, контролирующей выходной сигнал мотонейронов или на сами мотонейроны (Jordan, L. M., 2014).

$M_2$ -ХР широко представлены в ЦНС и на периферии (Levey, A. I., 1993). Так, около 90% М-ХР спинного мозга мыши представлены  $M_2$ -подтипом (Duttaroy, A., 2002). Несмотря на то, что  $M_2$ -холинорецепторнокаутные животные не продемонстрировали никаких явных изменений в координации движений (Gomez, 1999), это не обязательно нивелирует роль  $M_2$ -ХР в увеличении возбудимости мотонейронов. Например, в отсутствие данных рецепторов может быть компенсаторная модуляция (от нисходящих серотонинергических систем) или усиление сигнала от интернейронов следующего порядка к мотонейронам (Miles, G. B., 2007).

Для генерации движений мотонейронам необходимо интегрировать входные сигналы (моторные команды), которые они получают, и генерировать на выходе сигнал, достаточный по силе, чтобы вызвать сокращение мышц. Активация  $M_2$ -ХР ведет к увеличению возбудимости мотонейронов посредством снижения амплитуды постгиперполяризации через изменение калиевого тока (Miles, G. B., 2007).

В качестве антагониста  $M_2$ -ХР тестировался метоктрамин. Как и телензепин, во всех экспериментах, где метоктрамин блокировал эдрофоний-индуцированную локомоцию, амплитуды электронейрограммы были снижены. Препарат способен увеличивать частоту локомоторных импульсов, одна-

ко в высокой концентрации может подавлять локомоцию. Это согласуется с концепцией действия  $M_2$ -холиноблокаторов непосредственно на мотонейроны, которые, как известно, обладают данными ХР (Jordan, L. M., 2014).

Предполагается, что в генерации ритма локомоторного паттерна принимают участие  $M_3$ -ХР. Последовательное добавление антагониста  $M_3$ -ХР 4-DAMP снижало локомоторный ритм и в конечном счете окончательно блокировало его. В отличие от атропина и метоктрамина, 4-DAMP не вызывал даже временного увеличения частоты локомоции (Jordan, L. M., 2014). Влияние таких препаратов как солифенацин и др. на локомоцию не изучалось.

$M_4$ -ХР находятся преимущественно в различных отделах переднего мозга, а их возбуждение угнетает механизм так называемой «направленной» активации нигростриарного пути, облегчающего локомоцию (Di Chiara, G., 1994). Мыши с дефицитом этого подтипа ХР показали небольшое, но статистически достоверное увеличение общей локомоторной активности, усиливающееся введением центрального  $D_1$ -агониста (Gomez, J., 1999).

Однако применение  $M_4$ -холиноблокатора МТ-3 в различных концентрациях не оказывало эффекта на эдрофоний-индуцированную локомоцию, что свидетельствует о том, что  $M_4$ -ХР не принимают участия в локомоторной деятельности (Jordan, L. M., 2014).

К настоящему времени  $M_5$ -ХР не обнаружены в вентральных рогах спинного мозга, а их специфические блокаторы не изучались (Wilson, J. M., 2004).

Таким образом, представленные в обзоре литературы данные свидетельствуют о том, что подтипы альфа-2 адренорецепторов и М- и Н-холинорецепторы имеют широкую распространенность в пределах головного и спинного мозга, в составе как относительно молодых структур (кора и др.), так и эволюционно более древних (ствол и спинной мозг), способных генерировать или же модулировать произвольные и непроизвольные движения различной степени сложности.

## 1.2. Патогенез черепно-мозговой травмы

### 1.2.1 Механизмы повреждения нейронов при черепно-мозговой травме

Механизмы, лежащие в основе патогенеза черепно-мозговой травмы могут быть разделены на (Werner, С., 2007):

- фокальные повреждения головного мозга в результате прямого контакта, опосредующие контузию, микроразрывы и внутричерепные кровотечения;
- диффузные повреждения в результате ускорения/торможения, являющиеся причиной диффузного аксонального повреждения или отека мозга.

Функциональный исход ЧМТ определяется двумя в значительной степени различными механизмами/стадиями (Werner, С., 2007):

- первичным механическим повреждением, возникающим в момент контакта. С точки зрения терапии данный этап повреждения не поддается лечению, возможно только его предотвращение.
- вторичным повреждением, представляющим из себя каскад патологических процессов и начинающимся в момент повреждения тканей мозга и развивающийся в последующие временные отрезки. Именно на этом этапе ЧМТ возможно фармакотерапевтическое вмешательство.

Начальный этап черепно-мозговой травмы характеризуется прямым повреждением тканей мозга и нарушенной регуляцией церебрального кровотока и метаболизма. Состояние, сходное с ишемией приводит к накоплению молочной кислоты из-за преобладания анаэробного пути окисления глюкозы, а также к повышению проницаемости плазматических мембран и последовательному образованию отека. Поскольку анаэробный гликолиз не может поддерживать на должном уровне синтез АТФ для нужд организма, происходит сбой работы энергозависимых ионообменных насосов, расположенных на поверхности клеточных мембран (Werner, С., 2007).

Второй этап патологического каскада опосредован конечной мембранной деполяризацией на фоне избыточного выброса возбуждающих нейротрансмиттеров (например, глутамата, аспартата и др.), активацией NMDA и AMPA рецепторов, а также открытием потенциал-зависимых  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  каналов. Последовательный вход ионов натрия и кальция внутрь клетки приводит к значительному повышению их концентрации в цитоплазме, активации катаболических процессов и гибели клетки.  $\text{Ca}^{2+}$  активируют перекисное окисление липидов, протеаз и фосфолипаз которые в свою очередь повышают внутриклеточную концентрацию свободных жирных кислот и свободных радикалов. Дополнительно, активация каспаз, транслоказ и эндонуклеаз инициирует структурные изменения биологических мембран и нуклеосомальной ДНК (её фрагментацию и ингибирование возможности восстановления). Все вместе это ведет к разрушению клеточных структур и конечному некрозу или апоптозу (Werner, C., 2007).

### Церебральные метаболические нарушения

Церебральный метаболизм (как показывают уровни потребления глюкозы и кислорода головным мозгом) и церебральный энергетический уровень (отражаемый уровнем креатинфосфата и АТФ в тканях или косвенно, соотношением лактат/пируват) часто снижаются после ЧМТ с присущей временной и пространственной гетерогенностью (Clark, R. S., 1994; Cunningham, A. S., 2005; Diringer, M. N., 2000; Glenn, T. C., 2003). При этом степень метаболических нарушений зависит от тяжести изначального первичного повреждения, и худший исход наблюдается у тех пациентов, у которых был ниже церебральный энергетический уровень (Wu, H.M., 2004). Посттравматическое нарушение уровня энергетического баланса приводит к нарушению работы митохондрий с последующим снижением образования АТФ и внутримитохондриальным избытком ионов кальция (Tavazzi, B., 2005; Verweij, B. H., 2000). Несмотря на то, что недостаток кислорода является одной из пер-



вопричин церебральных метаболических нарушений, использование гипероксигенации не приводит к достаточному терапевтическому эффекту (Magnoni, S., 2003; Menzel, M., 1999). Интересно также, что уровень энергопотребления головным мозгом может быть как связан (Cunningham, A. S., 2005), так и не связан с уровнем мозгового кровотока (Clark, R. S., 1997; Diringer, M. N., 2000).

### Эксайтотоксичность и окислительный стресс

Первичное и вторичное повреждение головного мозга при черепно-мозговой травме сопровождается избыточным выбросом возбуждающих нейротрансмиттеров, в особенности глутамата (Bullock, R., 1998; Robertson, C. L., 2001). Избыток внеклеточного глутамата действует на нейроны и астроциты, а именно на ионотропные и метаботропные глутаматные нарушая нормальный ток ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . И хотя данные события запускают катаболические процессы внутри клеток, клетки стремятся нормализовать ионный баланс, расходуя энергию на работу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы, в результате чего замыкается порочный круг (Wrenn, C. S., 2015).

Окислительный стресс связан с генерацией активных форм кислорода (свободных кислородных радикалов и образованных ими супероксида, перекиси водорода, оксида азота и пероксинитрила) митохондриями клеток головного мозга в ответ на травматическое воздействие. Избыточное образование свободных радикалов в результате глутаматной эксайтотоксичности и истощения эндогенных антиоксидантных систем опосредует окисление клеточных и сосудистых структур, всевозможных структурных белков, расщепление ДНК и ингибирование дыхательной цепи митохондрий (Bayir, H., 2005; Shao, C., 2006; Zhao, Z. C., 2005). И хотя данных механизмов бывает достаточно для немедленной гибели клеток, окислительный стресс также индуцирует процессы воспаления и апоптоза (Zhao, Z. C., 2005).

## Отек мозга

Частым патологическим явлением после ЧМТ является отек мозга – вазогенный или цитотоксический. Вазогенный отек вызван разрушением или нарушением барьерной функции эндотелия (основной структуры гематоэнцефалического барьера) сосудов. Нарушение целостности сосудов головного мозга приводит к неконтролируемому току ионов, белков и воды в межклеточное (интерстициальное) пространство. Цитотоксический отек характеризуется накоплением воды внутри нейронов, астроцитов и микроглиальных клеток вне зависимости от целостности стенок сосудов. Данный вид отеков вызван патологическим повышением проницаемости клеточных мембран, нарушением работы АТФ-зависимых каналов и реабсорбцией осмотически активных растворов. Хотя цитотоксические отеки на практике встречаются чаще, чем вазогенные, оба вида приводят к неконтролируемому подъему внутричерепного давления, что входит в каскад вторичных повреждающих факторов (Werner, С., 2007).

## Воспаление

Также, ЧМТ запускает комплекс иммунных/воспалительных изменений ткани мозга по аналогии с реперфузионным повреждением после ишемии. И первичные и вторичные повреждения активируют выброс медиаторов клетками, включая провоспалительные цитокины, простагландины, свободные радикалы и систему комплемента. Данные процессы индуцируют хемокины и молекулы клеточной адгезии и, в итоге, параллельно мобилизируют иммунные и глиальные клетки (Lucas, S.M., 2006; Potts, M. В., 2006). Например, активированные полиморфоядерные лейкоциты прикрепляются как к поврежденному, так и интактному слою эндотелиальных клеток благодаря молекулам клеточной адгезии. Данные клетки вместе с макрофагами и Т-лимфоцитами превращают поврежденные ткани в тканевой инфильтрат ко-

торый со временем подвергается резорбции. Повышение экспрессии провоспалительных ферментов, таких как ФНО, ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 происходит в течение нескольких часов после травмы. Увеличение степени повреждения тканей мозга связано с прямым выбросом нейротоксичных медиаторов или косвенно благодаря через NO и цитокины. Дополнительный выброс вазоконстрикторных веществ (простагландинов и лейкотриенов), облитерация сосудов лейкоцитами и тромбоцитами, повреждения гематоэнцефалического барьера и образование отека снижают перфузию тканей кровью, что в последующем усугубляет тяжесть вторичного повреждения (Werner, С., 2007).

### Некроз и апоптоз

Исходом повреждения клеток головного мозга после ЧМТ может быть один из 2-х процессов клеточной гибели: некроз или апоптоз. Некроз возникает в ответ на тяжелое механическое или ишемическое/гипоксическое повреждение тканей на фоне избыточного выброса возбуждающих медиаторов и нарушения энергетического обмена. Далее активированные фосфолипазы, протеазы и липопероксидазы расщепляют биологические мембраны. Образовавшиеся в результате клеточные «обломки» распознаются как антигены и подвергаются дальнейшему разрушению клетками иммунного ответа (Werner, С., 2007).

В противоположность этому, клетки, подвергающиеся апоптозу, морфологически интактны в течение начального периода после ЧМТ. Более того, уровень производимого их митохондриями АТФ достаточен для поддержания адекватного мембранного потенциала. Процесс апоптоза становится заметен в течение часов или дней после первичного повреждения. Транслокация фосфатидилсерина запускает прерывистую, но прогрессирующую мембранную дезинтеграцию наравне с лизисом ядерных мембран, конденсацией хроматина и фрагментацией ДНК. Апоптоз как механизм требует для своего протекания затрат энергии АТФ и дисбаланса между естественно присут-

ствующими про- и антиапоптотическими белками. Поскольку апоптотическая гибель клеток имеет отсроченное начало, она представляет интерес как процесс, в который можно вмешиваться, увеличивая выживаемость клеток головного мозга после травмы (Werner, C., 2007).

### 1.2.2 Нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера и белковый состав спинномозговой жидкости после ЧМТ

Гематоэнцефалический барьер является одним из главных факторов, поддерживающим замкнутую, строго контролируемую среду, необходимую для выживания клеток головного мозга. Структурно ГЭБ представляет из себя композицию из эндотелиальных клеток, окруженных и поддерживаемых другими клетками, такими как астроциты, перициты и нейроны. Необходимо подчеркнуть важность астроцитов в регуляции работы ГЭБ, поскольку отростки астроцитов тесно контактируют с эндотелием сосудов. Все окружающие клетки играют свои особые роли в поддержании барьерной функции, образуя глиоваскулярные единицы, где глиальные и эндотелиальные клетки функционально взаимодействуют в паракринной манере (Alves, J. L., 2014).

В настоящее время трансляционные исследования все больше и больше фокусируются на функциональных аспектах реакции головного мозга на травму, переходя от клеточных исследований к физиологическим концепциям, например к регуляции работы ГЭБ. Разрывы тесных щелевых контактов и базальной мембраны приводит к повышенной парацеллюлярной проницаемости. Провоспалительный статус, вызывающий окислительный стресс и повышение экспрессии молекул клеточной адгезии обеспечивает приток клеток к паренхиме мозга через ГЭБ, участвующих в воспалении, приводя к гибели нейронов и прогрессированию повреждения (Neuwelt, E., 2008).

### 1.3 Нарушения функций контроля движений в ЦНС при черепно-мозговой травме

Утверждение, что черепно-мозговая травма может быть причиной двигательных нарушений является общепризнанным. На сегодняшний день описаны всевозможные виды двигательных расстройств, возникающих в результате травмы мозга, однако наиболее известными являются кинетический тремор и дистония, возникающие в результате тяжелой черепно-мозговой травмы (Таблица 1), однако связь между легкой или умеренной черепно-мозговой травмой и моторными нарушениями изучена в меньшей степени (Таблица 2). Дополнительно изучаются возможные причинно-следственные связи между черепно-мозговой травмой и нейродегенеративными заболеваниями, например болезнью Паркинсона (Ben-Shlomo, Y., 1996; Formisano, R., 2014).

Таблица 1 – Частота возникновения двигательных нарушений после тяжелой ЧМТ (Krauss, J. K., 2002)

Двигательные нарушения	Временные (%)	Устойчивые (%)
Низкочастотный интенционный тремор (2,5-4 Гц)	1,4	0,9
Постуральный/кинетический тремор (2,5-4 Гц)	-	3,2
Постуральный/кинетический тремор (>4 Гц)	4,1	3,6
Неклассифицированный тремор	4,5	1,4
Фокальная дистония	0,5	1,8
Гемидистония	-	0,9
Гемидистония+контралатеральная фокальная дистония	-	0,9
Гемидистония+цервикальная	-	0,5

Двигательные нарушения	Временные (%)	Устойчивые (%)
дистония		
Стереотипия	-	0,9
Миоклонус	-	0,5
Паркинсонизм	-	0,9
Пароксизмальная гипногенная дискинезия	-	0,5
Гиперэкплексия	-	0,5

Примечание: данные представлены в процентах от общего числа пациентов (n=221), участвовавших в исследовании, со средним сроком наблюдения 3,9 лет. Многие пациенты имели больше 1 нарушения (Krauss, J.K., 1996).

Таблица 2 – Частота возникновения двигательных нарушений после легкой или умеренной ЧМТ (Krauss, J. K., 2002)

Двигательные нарушения	Временные (%)	Устойчивые (%)
Постуральный/интенционный тремор (>4 Гц)	8,2	1,3
Гиперэкплексия	-	0,6
Цервикальные миоклонические подергивания	-	0,6

Примечание: данные представлены в процентах от общего числа пациентов (n=158), участвовавших в исследовании со средним сроком наблюдения 5,2 лет. Один из пациентов имел как временные, так и устойчивые двигательные нарушения (Krauss, J.K., 1997).

Одним из наиболее частых двигательных нарушений после ЧМТ является тремор, при этом, наихудшим образом на выполнении повседневных задач сказываются высокоамплитудные постуральные и кинетические виды тремора (Kremer, M., 1947; Samie, M. R., 1990). Большинство пациентов с посттравматическим тремором имеют в анамнезе черепно-мозговую травму за-

медления, и результаты клинических исследований говорят о том, что у этих больных было диффузное аксональное повреждение (Adams, J. H., 1989). Данное утверждение подтверждается нейрорадиологическими исследованиями. В серии исследований с участием 19 пациентов с посттравматическим кинетическим тремором у 18 было диффузное аксональное повреждение, при этом у таких больных на снимках МРТ обнаруживались атрофия мозолистого тела, вентрикуломегалия, стволовые и субкортикальные повреждения, а также повреждения дендроталамических путей (Krauss, J. K., 1995).

Прогноз развития посттравматического тремора сложно предугадать в начальный период клинических проявлений. Он может ослабнуть или, вообще, исчезнуть спонтанно в течение 1 года после начала. Общеизвестно, что посттравматический тремор трудно поддается лечению. Сообщается, что глутетемид, изониазид, L-триптофан, пропранолол, бензодиазепины, карбамазепин, леводопа/карбидопа и холиноблокаторы способны снижать выраженность посттравматического тремора (Ellison, P. H., 1978; Harmon, R. L., 1991; Jacob, P. C., 1995).

Дистония, еще один из видов посттравматических двигательных нарушений, характеризуется произвольными, устойчивыми мышечными сокращениями противоположных мышц, что приводит к повторяющимся крутящимся движениям или ненормальным позам (Jankovic, J., 2008). Дистония как двигательное нарушение часто не распознается и не диагностируется, так как полный спектр феноменологии до конца не изучен. Дистония может сопровождаться тремором или миоклоническими подергиваниями. Она может проявляться и в состоянии покоя, но обычно выявляется при выполнении произвольных движений (Krauss, J. K., 2002).

Практически все пациенты с посттравматической дистонией имеют фокальные церебральные повреждения. В серии исследований, семь из восьми пациентов с гемидистонией имели повреждения хвостатого ядра или скорлупы (Krauss, J. K., 1992), однако в случае изолированного повреждения бледного шара дистония возникает редко (King, R. W., 2001). Иногда гемидисто-

ния или фокальная дистония, в особенности дистония верхней конечности являются следствием таламических повреждений (Trankle, R., 1997). Контралатеральные мезенцефалические повреждения были обнаружены у пациентов с гемидистонией и кривошеей (Krauss, J. K., 1992). Слабовыраженные дистонические нарушения позы у пациентов с посттравматическим кинетическим тремором могут быть связаны, также с травмами мезенцефалической области головного мозга и также с повреждениями дендроталамических путей (Krauss, J. K., 1994). И хотя в одном из исследований пять из семи пациентов с гемидистонией дополнительно к повреждениям хвостатого ядра и скорлупы имели также кортикальные и субкортикальные повреждения, предполагается, что сами по себе травмы коры головного мозга без областей базальных ганглий и таламуса не приводят к развитию дистонии. Интересным является тот факт, что у здоровых людей изолированные повреждения бледного шара могут вызывать дистонию, но у больных с дистонией повреждение или стимуляция этой структуры может иметь положительный эффект (Krauss, J. K., 2002).

Стандартным течением посттравматической дистонии является медленное ухудшение состояния пациента до определенного момента стабилизации. Фармакотерапия обычно оказывается неэффективной. Иногда может быть слабый положительный ответ на антихолинергические средства. У пациентов с кривошеей и другими фокальными видами дистонии средствами выбора являются инъекции ботулинического токсина (Krauss, J. K., 2002).

Также последствиями черепно-мозговой травмы могут быть и другие двигательные нарушения, такие как хореобаллистическая гиперкинезия, пароксизмальная дискинезия и тики. Более того, сообщается об опсоклонус-миоклонус синдроме, стереотипии и акатизии (Krauss, J. K., 2002).



#### 1.4 Фармакологическая коррекция последствий повреждений ЦНС

Травматические повреждения ЦНС инициируют вторичные биохимические изменения, вызывающие нарушения работы и гибель нервных клеток. Значительное количество исследований было направлено на установление механизмов, лежащих в основе вторичного повреждения с целью разработки лекарственных средств, обладающих нейропротекторным действием. К основным этапам патологического каскада, приводящего к гибели нейронов и глиии относятся процессы глутаматной эксайтотоксичности, митохондриальной дисфункции, окислительного стресса, воспаления, нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера, апоптоза и многие другие.

На сегодняшний день нет единой и строгой классификации нейропротекторных средств, однако общепринятой является разделение данных средств на группы в зависимости от механизма действия, например, средства, влияющие на процесс глутаматной эксайтотоксичности (антагонисты NMDA-рецепторов, блокаторы  $Ca^{2+}$ -каналов), антиоксиданты и антигипоксанты, нейротрофические факторы средства, ингибирующие процессы апоптоза и др.

Несмотря на многочисленные успехи экспериментальных и доклинических исследований, более 30 клинических испытаний в III фазе не продемонстрировали положительного эффекта у больных (Loane, D. J., 2010). Данные результаты можно объяснить тем, что большинство из исследований были направлены на поиск средств, действующих только на одно из звеньев или механизмов вторичного повреждения.

В последнее время приобретает популярность концепция поиска и изучения средств способных действовать сразу на несколько механизмов патологического каскада, так называемых, «multipotential drugs». С данной точки зрения рассматриваются как перспективные: статины (регулируют процессы эксайтотоксичности, воспаления, барьерной функции ГЭБ, образования отека и апоптоза), прогестерон (эксайтотоксичность, окислительный стресс, воспа-

ление, отек и апоптоз), циклоспорин А (митохондриальная дисфункция, окислительный стресс и апоптоз), ингибиторы клеточного цикла, например, флавопиридол и росковитин (воспаление и апоптоз) и многие другие (Loane, D. J., 2010).

К средствам, реализующим свое нейропротекторное действие за счет нескольких механизмов могут быть также отнесены агонисты альфа-2 адренорецепторов (клонидин, дексмететомидин и др.), а также производные этаноламина (например, соли диметилэтанолamina и цитиколин).

#### 1.4.1 Агонисты альфа-2 адренорецепторов как нейропротекторные и нейрореабилитационные средства

Начиная с 70-х годов прошлого столетия, агонисты альфа-2 адренорецепторов использовались, в основном, как антигипертензивные средства. Классическим агонистом альфа-2 адренорецепторов является клонидин (Giovannitti, J. A., 2015). Общеизвестными эффектами клонидина и клонидино-подобных лекарственных средств являются антигипертензивное, анальгетическое, седативное и противотревожное (анксиолитическое) действие (Kamibayashi, T., 2000). Кроме того, агонисты альфа-2 адренорецепторов применяются для лечения синдрома отмены (Albertson, T. E., 2014), а также при синдроме дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ-синдроме) у взрослых и детей (Bidwell, L. C., 2011), в том числе для лечения бессонницы у последних (Nguyen, M., 2014). Более селективные средства из данной группы (например, дексмететомидин) используются для премедикации при введении пациента в наркоз перед операцией (Davis, P. J., 2011). Предложено также использование агонистов альфа-2 адренорецепторов в педиатрической практике - в качестве превентивной меры при возникновении делирия после общей анестезии (Amorim, M. A., 2017).

Большой интерес представляет изучение возможности применения агонистов альфа-2 адренорецепторов в терапии психических и тревожных рас-

стройств, а также для лечения последствий травматических или сосудистых повреждений ЦНС, часто являющихся причиной вышеуказанных нарушений. Например, в клинической практике гуанфацин (агонист преимущественно альфа-2<sub>A</sub> рецепторов (Jasper, J. R., 1998)) изучается в качестве анксиолитического средства для лечения генерализованных и сепарационных тревожных расстройств (Strawn, J. R., 2017). Другой агонист, тизанидин (данные по селективности отсутствуют в публичном доступе) показал эффективность в терапии спастичности у пациентов, перенесших черепно-мозговую травму (Meuthaler, J. M., 2001). Клонидин (агонист преимущественно альфа-2<sub>A</sub> рецепторов (Jasper, J. R., 1998)) рекомендуется в качестве средства, способного снижать выраженность нарушений сна и гипервозбудимость у больных с посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР) (Boehnlein, J. K., 2007).

В экспериментах агонисты альфа-2 адренорецепторов оказались способны снижать выраженность неврологического дефицита и улучшать гистоморфологическую картину головного мозга у животных после инсульта при введении до или во время ишемии (Jellish, W. S., 2005; Yanli, L., 2016; Zhang, Y., 2004).

Мета-анализ, включающий в себя 9 рандомизированных плацебо-контролируемых исследований с участием 879 пациентов с ишемией головного мозга показал, что дексмететомидин способен снижать выброс воспалительных медиаторов и нейроэндокринных гормонов, в то же время поддерживая внутричерепной гомеостаз и снижая объемы повреждения головного мозга (Jiang, L., 2017).

Также альфа-2 агонисты при повреждениях ЦНС у различных животных оказывают разное влияние на локомоторную активность. Эффективность альфа-2 агониста клонидина неоднократно продемонстрирована на спинализированных кошках. Его введение вызывало появление хорошо организованного, более длительного цикла шагания. Однако в некоторых случаях он не оказывал эффекта при неполной перерезке спинного мозга или у интактных животных (Chau, C., 1998b).

Другие альфа-2 агонисты, такие как тизанидин и оксиметазолин в экспериментах на кошках с перерезанным спинным мозгом после предварительной электростимуляции *n. peroneus superficialis* модулировали локомоторный паттерн в клонидино-подобной манере с некоторыми отличиями (Таблица 3).

В отличие от кошек, у спинализированных крыс применение клонидина (0,4-0,5 мг/кг) приводило к нарушению ходьбы, инициированной электрической стимуляцией, снижало продолжительность и амплитуду пачек ЭМГ в мышцах сгибателях, вызывало паттерны шагания, характеризующиеся прыжками или полный паралич (Musienko, P., 2011).

У людей с тяжелыми травмами спинного мозга этот препарат в низких дозах также приводил к значительному ухудшению локомоторной активности (Dietz, V., 1995). Возможно, данный эффект связан с подавлением тонуса мышц, который важен для поддержания позы во время локомоции.

В свете таких спорных и ограниченных данных об эффектах клонидина, важно более глубокое понимание механизмов действия данного препарата, а также знание типов и свойств рецепторов, вовлеченных в эти механизмы. Также необходимо изучение различных альфа-2 агонистов, т.к. каждый из них индивидуален по своим физико-химическим свойствам. Сравнительный анализ свойств альфа-2 агонистов позволит выявить средство, который будет обладать наибольшим терапевтическим потенциалом, при минимуме нежелательных лекарственных реакций.

Таблица 3 – Влияние адренотропных средств на локомоцию (Chau, C., 1998b)

Вещество	Доза (ммоль/животное интратекально)	Дни после спинализации	Влияние на локомоцию
Клонидин ( $\alpha_2$ -агонист)	0.9-3.8	11-277	↓ Поддержки веса и сгибания в коленном суставе (9/12), ↑↑ Длительности шага (12/12), ↑↑ Длины шага (12/12), ↑↑ Волочения лапы (12/12)
Оксиметазолин ( $\alpha_2$ -агонист)	0.3-3.4	10-132	↓ Поддержки веса, ↑↑ Длительности шага (7/7), ↑ Волочения лапы (6/7)
Тизанидин ( $\alpha_2$ -агонист)	1.0-4.7	105-240	↓ Поддержки веса, ↑↑ Длины шага (7/7), ↑↑ Длительности цикла шагания (7/7), ↑↑ Волочения лапы (7/7)
Метоксамин ( $\alpha_1$ -агонист)	4.0	11-200	↑ Поддержки веса (9/11), ↑ Длительности цикла шагания (9/11), ↑ Двигательной активности хвоста (7/11)
Норэпинефрин (смешанный агонист)	4.7-10.7	27-164	Поддержка веса варьирует, ↑ Длины шага (6/6), ↑ Длительности цикла шагания (6/6), ↑ Волочения лапы (5/6)
Йохимбин (антагонист альфа-2 адреноре-	0,4-0,5 мг/кг подкожно	35-66	↓ Волочения лапы, ↑↑ Стабильности траектории движений конечностей, ↑ Межконечностной координации

Вещество	Доза (мМоль/животное интратекально)	Дни после спинализации	Влияние на локомоцию
цепторов)*			

Примечание: доза препарата рассчитывалась на 1 животное. Все инъекции осуществлялись однократно интратекально. В круглых скобках представлена частота наблюдения определенного эффекта к общему количеству проведенных экспериментов на 4-х спинализированных кошках. Все параметры эпидуральной стимуляции (частота, 0.4 Гц, продолжительность импульса, 250 мс) оставались постоянными до и после введения препаратов.

\* Влияние йохимбина на локомоцию изучалось в экспериментах на спинализированных крысах после предварительной эпидуральной стимуляции

↑↑ - Значительное увеличение значения параметра, ↑ - увеличение значения параметра, ↓ - уменьшение значения параметра.

Локомоторные паттерны, индуцированные агонистами альфа-2 адренорецепторов (клонидин, тизанидин и оксиметазолин), отличаются от таковых, вызванных агонистами альфа-1 адренорецепторов (Chau, C., 1998b):

1. Альфа-2 агонисты обладают способностью вызывать локомоцию у кошек в течение нескольких минут в течение первой недели после спинализации, в то время как альфа-1 агонисты не так эффективны (так, в случае метоксамина потребовалось более 3 часов, чтобы его действие оказалось заметным).

2. Альфа-2 агонисты одинаково хорошо модулируют хорошо установленный локомоторный паттерн у спинализированных кошек спустя длительное время после спинализации, значительно увеличивая угловые отклонения, длительность шагательного цикла и, особенно, продолжительность локомоторной активности. Альфа-1 агонисты не вызывают таких эффектов.

3. Альфа-2 агонисты снижают кожную возбудимость, в противоположность ее увеличению метоксамином.

4. Альфа-1 агонисты увеличивают способность держать вес нижними конечностями, в то время как альфа-2 агонисты никак не влияли или же снижали такую способность.

5. Альфа-2 агонисты увеличивают волочение лапы в начале колебания, в отличие от метоксамина.

6. Имеются различия среди альфа-2 агонистов во влиянии на способность удерживать вес тела и модуляции кожных рефлексов.

Альфа-2 антагонист йохимбин (0,4-0,5 мг/кг) улучшал локомоцию у крыс, модулируя различные параметры противоположно клонидину. Блокада альфа-2 рецепторов приводила к уменьшению волочения лапы и существенному улучшению стабильности траектории движения конечностей, а также межконечностной координации. По сравнению с локомоцией, вызванной эпидуральной электростимуляцией, амплитуда и продолжительность пачек ЭМГ дистальных мышц разгибателей увеличивались. Детальный анализ показал, что альфа-2 антагонисты принципиально улучшают повторяемость

шагательных движений и некоторые параметры, характеризующие разгибание задних конечностей (Musienko, P., 2011).

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

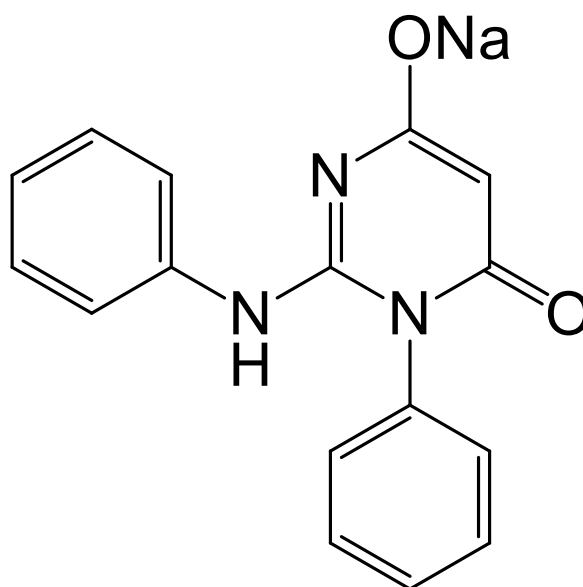


Рисунок 1 – Структурная формула мафедина

В серии предварительных исследований мафедин продемонстрировал гипотензивную активность, обусловленную возбуждением альфа-2 адренорецепторов в ЦНС (Анисимова, Н. А., 1984). Например, альфа-2 антагонист йохимбин блокировал гипотензивное действие мафедина, в то время как селективный альфа-1 антагонист празозин не оказывал никакого действия (Анисимова, Н. А., 1984). Важно, что разрез по каудальной границе продолговатого мозга у крыс приводил к тому, что мафедин переставал оказывать гипотензивное действие, что подтверждает предположение о центральном действии изучаемого средства (Анисимова, Н. А., 1984). В сравнении с клонидином он оказывал более медленное, равномерное и длительное гипотензивное действие (Анисимова, Н. А., 1984). После отмены препарата не отме-



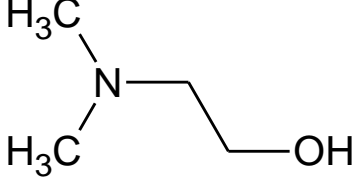
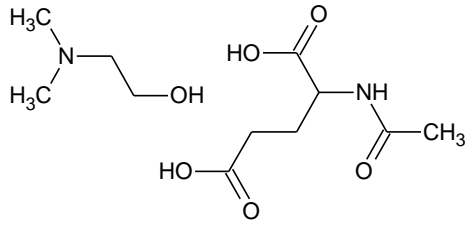
чалось резкого повышения артериального давления (синдрома отмены), характерного для клонидина (Анисимова, Н. А., 1984).

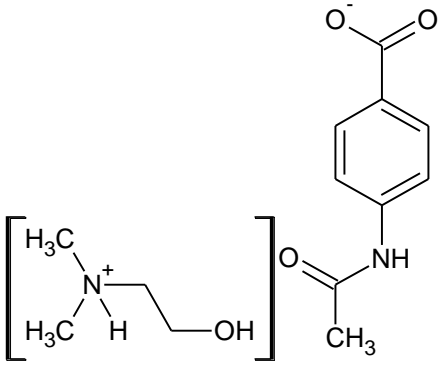
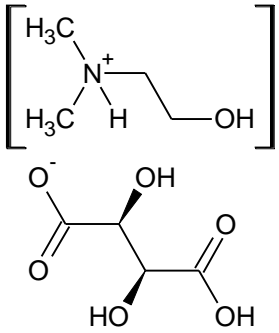
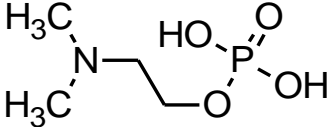
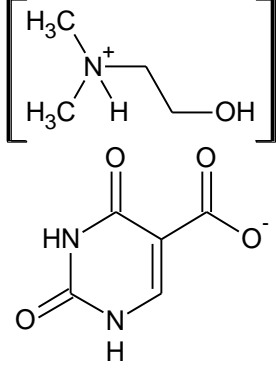
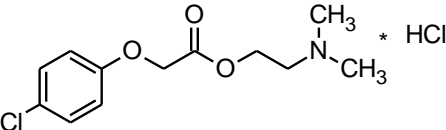
В связи с тем, что мафедин является центральным альфа-2 адреномиметиком и, в отличие от клонидина в меньшей степени угнетает ЦНС (Анисимова, Н. А., 1984), его изучение в качестве нейрореабилитационного средства может быть перспективным.

#### 1.4.2 Производные этаноламина как нейропротекторные/нейрореабилитационные средства

Одной из перспективных групп нейропротекторных и ноотропных средств являются производные этаноламина. На сегодняшний день ряд производных этаноламина, в частности, соли и эфиры диметилэтанолamina (ДМЭА), активно используются в неврологической практике в различных странах (Таблица 4).

Таблица 4 – Некоторые производные этаноламина, которые используются/использовались в клинической практике

№ п/п	Химическое название	Торговое название	Химическая формула
1.	2-Диметилэтанолaмин	Диметилэтанолaмин (Деанол)	
2.	2-Диметиэтанолaмино, 2-(ацетамидо)пентандиовая кислота (Диметилэтанолaмина ацеглумат)	Нооклерин	

№ п/п	Химическое название	Торговое название	Химическая формула
3.	<i>N,N</i> -диметил-2- гидроксиэтанаминия 4- ацетамидобензоат (Диметилэтанолamina п- ацетамидобензоат)	Деанер	
4.	<i>N,N</i> -диметил-2- гидроксиэтанаминия (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3- карбокси-2,3- дигидроксипропаноат (Диметилэтанолamina битартрат)	—	
5.	2-(диметиламино) этилдигид- рофосфат ( <i>N,N</i> - Диметилэтанолamina монофосфат)	Панкар (Панклар)	
6.	<i>N,N</i> -диметил-2- гидроксиэтанаминия 2,4- диоксопиримидин-5- карбоксилат (Диметилэтанолamina оротат)	Диметил- этанолами- наоротат	
7.	(2-(диметиламино)этил)-2-(4- хлорфенилокси)ацетат гидро- хлорид (Диметилэтанолamin п- хлорофеноксиацетат гидро-	Ацефен	

№ п/п	Химическое название	Торговое название	Химическая формула
	хлорид)		
8.	<i>N,N</i> -диметил-2-гидроксиэтанаминия 5-оксопирролидин-2-карбоксилат (Диметилэтанолamina пироглутамат)	—	
9.	5'-О-(гидрокси( {гидрокси(2-(триметиламмоний)этокси)фосфорил} окси)фосфорил)цитидин (Цитиколин)	Цераксон	
11.	2,3-дигидроксипропил 2-(триметиламмоний)этилфосфат (Холина альфосцерат)	Глиатилин	

Пик изучения производных диметилэтанолamina и его солей приходится на 60-70-е года прошлого века. Тогда данные соединения рассматривались как перспективные средства для лечения многих неврологических заболеваний, сопровождающихся гибелью нервных клеток, например, черепно-мозговая травма, болезнь Альцгеймера, хорея Гентингтона и других. В последние 10 лет особый интерес приобретают соединения, так же содержащие этаноламинную структуру, например, холина альфосцерат, деанола ацеглумат и, особенно, цитиколин. Несмотря на то, что открываются все новые и новые механизмы действия для каждого из них, в целом, они имеют много общих фармакологических свойств.

По мнению большинства авторов, ДМЭА проникает через гематоэнцефалический барьер, захватывается нейронами и клетками нейроглии, и непосредственно в нейронах метилируется до холина, включаемого в синтез ацетилхолина – одного из основных нейромедиаторов, участвующих в процессах обучения и памяти (Kewitz, H., 1976). Даже незначительного добавочного количества холина достаточно для насыщения процесса образования ацетилхолина, а его избыток может использоваться для синтеза фосфолипидов (Haubrich, D. R., 1975).

В то же время, некоторые авторы предполагают, что для ДМЭА прекурсорный холиномиметический эффект не является ведущим. Например, в исследовании Weineret W. J. et al., проведенном на морских свинках, которым предварительно вводился амфетамин (предполагается, что средства, обладающие холиномиметическим действием, способны снижать выраженность амфетамин-индуцированного стереотипного поведения), он не продемонстрировал центрального холиномиметического действия (Weiner, W. J., 1976). Также, показано, что деанол, в отличие от холина, не вызывает периферических холиномиметических эффектов (Davis, K. L., 1976).

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

- 1) увеличивает в головном мозге количество свободного холина, доступного для синтеза ацетилхолина, регулируя его высвобождение из фосфолипидов за счет кальций-зависимой обменной реакции (Freeman, J. J., 1976).
- 2) снижает проницаемость гематоэнцефалического барьера для холина, уменьшая его «отток» из головного мозга (Cornford, E. M., 1978).
- 3) непосредственно взаимодействует с холинергическими рецепторами или же стимулирует выброс ацетилхолина (Kostopoulos, G. K., 1975; Pomeroy, A. R., 1972).
- 4) повышает уровень холина в плазме (Kanfer, J. N., 1988), который в свою очередь может увеличивать или уменьшать количество доступного

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

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

6) некоторые производные ДМЭА (диметилэтанолamina п-хлорофеноксиацетат) при введении старым крысам способны приводить к улучшению синаптических морфометрических параметров, приближая их к значениям молодых животных (Giuli, C., 1980).

7) уменьшает процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижая образование малонового диальдегида, лизофосфолипидов и повышая активность супероксиддисмутазы и уровень восстановленного глутатиона в тканях.

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

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

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

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

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

- 5) стимуляция нейрогенеза (Diederich, K., 2012);
- 6) активация ангиогенеза через усиление экспрессии сосудистого фактора роста (VEGF) (Gutiérrez-Fernández, M., 2012). Данный эффект может быть связан с активацией субстрата инсулинового рецептора-1 (Insulin receptor substrate-1, IRS-1) – модулятора дифференциации клеток сосудистого эндотелия (Rosell, A., 2013), вносящего вклад в экспрессию VEGF (Ferrara, N., 1999);
- 7) N-ацетил-аспартат (NAA) – важный метаболит, расположенный, в основном, в пирамидальных нейронах. NAA, вовлеченный в процессы нейрональной пластичности, аксон-глиальной передачи, энергообразования в митохондриях и метаболизма миелина, рассматривается как суррогатный маркер целостности и жизнеспособности нервных клеток (Moffett, J. R., 2007). Прием цитиколина метамфетамин-зависимыми пациентами в течение 4 недель в дозе 2000 мг/сутки, приводил к устойчивому увеличению уровня NAA (а также холина) в префронтальной коре после 2-й и 4-й недель лечения (Yoon, S. J., 2010).

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

Наиболее широко холина альфосцерат изучался у пациентов с деменцией различной этиологии. Так, в сравнительном исследовании с участием 565 пациентов с нейродегенеративной деменцией на фоне введения препарата (перорально 1200 мг/сутки в течение 3-6 месяцев или внутримышечно 1000 мг/сутки 3 месяцев) было отмечено улучшение состояния пациентов, особенно имевших нарушения памяти и концентрации внимания. По эффективности холина альфосцерат превзошел ацетил-L-аргинин. У 789 пациентов

с сосудистой деменцией использование препарата улучшало память и концентрацию внимания, снижало выраженность аффективных и соматических расстройств. По шкале SCAG у этих больных холина альфосцерат оказался эффективнее цитиколина (Amenta, F., 2001).

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

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

В качестве перспективного нейропротекторного средства, предполагаемого сочетающего холинергическую активность с антигипоксической и мембранопротекторной активностью и улучшающего энергетику нервных клеток может рассматриваться новое производное диэтилэтанолamina бис{2-((2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси)-N, N-диэтилэтанаминия} бутандиоат (Рисунок 2). В условиях эксперимента было показано, что на модели ишемии головного мозга у крыс данное соединение улучшает координацию движений, а также увеличивает 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 этого соединения (Титович, И. А., 2016).

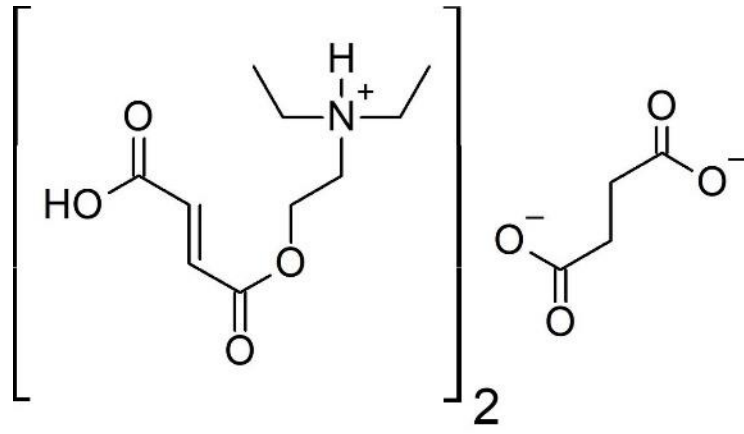


Рисунок 2 – Структурная формула ФДЭС



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа проведена в виде нескольких этапов.

Первым этапом является изучение роли подтипов альфа-2 адренорецепторов на модели острой децеребрированной кошки.

На втором этапе исследовались свойства мафедина как агониста альфа-2<sub>c</sub> адренорецепторов на модели зебраданио в тесте «Новый аквариум».

Третий этап – изучение механизма нейропротекторного действия ФДЭС на клеточной культуре гиппокампа

Четвертый этап – моделирование у крыс черепно-мозговой травмы методом «Контролируемого кортикального удара» и применение исследуемых соединений в качестве средств нейрореабилитации.

### 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.

Децеребрация, проводимая на разных уровнях головного мозга, позволяет устранить влияние от вышележащих отделов, для того, чтобы исследовать свойства и возможности спинальных и стволовых структур, находящиеся каудальнее места перерезки. Кроме того, после проведения децеребрации нет необходимости в наркотизации животного (Silverman, J., 2005), что является несомненным достоинством модели при проведении фармакологических исследований, т.к. исключается возможность рецепторного влияния анестетика.

Животным (n=4) вводили внутримышечно рометар (0,1 мл/кг), после чего следовало ингаляционное введение изофлурана (1,5-2,5%) с кислородом. Уровень анестезии контролировали тестами на чувствительность лап при ме-

ханическом давлении на кожу, а также путем проверки реакции зрачков на свет. Перед проведением децеребрации одновременно с трахеостомией осуществляли перевязку общих сонных артерий. Голова и позвоночный столб жестко фиксировали в металлической раме. Далее проводили трепанацию черепа, открывали доступ к четверохолмьям среднего мозга, осуществляли преколликулярную 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.

Действие анестезии прекращалось после хирургических вмешательств, а эксперименты начинались через 6-8 ч после децеребрации. В ходе эксперимента непрерывно отслеживали показатели частоты дыхательных движений, частоты сердечных сокращений, среднего артериального давления, электрокардиограммы, ректальной температуры, которая поддерживалась на уровне 37-38°C. Снятие показаний состояния децеребрированных животных начинали при хирургических манипуляциях и продолжали в течение всего опыта.

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 для каждого шага:

- 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 максимальная длина опоры;
- длину переноса кончика стопы, плюснефалангового, голеностопного и коленного суставов;
- максимальную высоту подъема кончика стопы, плюснефалангового, голеностопного и коленного суставов;
- внутриконтрактную 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 (проволока из нержавеющей стали AS632; Cooner Wire, Chatsworth, CA, диаметром 0,2 мм с тефлоновым покрытием) имплантировали билатерально в икроножную мышцу (*m. gastrocnemius lateralis*, Gast, разгибатель голеностопного сустава), латеральную широкую мышцу бедра (*m. vastus lateralis* (Vast), разгибатель колена) и большеберцовую мышцу (*m. tibialis* (Tib), сгибатель голеностопного сустава).

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 каждой двух последовательных пар пачек рассчитывали асимметрию длительности пачек, как  $T_1 - T_2 / (T_1 + T_2)$ , где  $T_1$  и  $T_2$  - длительности двух последовательных пачек.

Дополнительно оценивали уровень реципрокности, уровень кросскорреляции пар мышц  $Bic-TAL$ ,  $MG L-TAL$ ,  $TAL-TAR$ ,  $Bic-TAR$  и уровень межконечностной координации по паре мышц  $TAL-TAR$ . 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  $TAL$  и  $TAR$ ,  $T_{TAL} - T_{TAR} / (T_{TAL} + T_{TAR})$ .

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 при нескольких условиях:

- 1) без действия антагонистов (базовый уровень);
- 2) после введения первого селективного антагониста альфа-2 адренорецепторов ( $2_A$ ,  $2_B$  или  $2_C$ );
- 3) второй базовый уровень;
- 4) после введения второго антагониста;
- 5) третий базовый уровень;
- 6) 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»

Несмотря на длительную историю использования агонистов и антагонистов альфа-2 адренорецепторов, их механизмы действия остаются малоизученными (Sanders, R. D., 2007), обуславливая необходимость их дальнейшего клинического и доклинического тестирования *in vivo*. В частности, для более точного понимания механизмов действия данной фармакологической группы необходимо детальное изучение физиологических функций различных подтипов альфа-2 адренорецепторов (2<sub>AD</sub>, 2<sub>B</sub> и 2<sub>C</sub>) в организме.

Эта задача может быть выполнена с использованием животной модели зебраданио (*Danio rerio*), которая является высокочувствительной биологической системой по отношению к широкому спектру фармакологических воздействий. Эти рыбы ввиду своей низкой стоимости, способности к быстрому размножению и созреванию, а также простоты условий содержания, являются прекрасным объектом для фармакогенетических и нейрофармакологических исследований (Kalueff, A. V., 2014).

Так, зебраданио имеют многочисленные генетические, анатомические и физиологические сходства ЦНС не только с грызунами, но и с человеком (Yanli, L., 2016). Например, около 70% генов зебраданио имеют хотя бы один ортолог человека, при этом 47% генов человека полностью такие же, как и у данного вида рыб (Howe, K., 2013).

Несмотря на различия в анатомии ЦНС между человеком и зебраданио, у последних имеются многие структуры головного мозга, выполняющие об-

щие для всех млекопитающих (и не только) функции. К таким структурам у *Danio rerio* можно отнести латеральную мантию (lateral pallium), отвечающую за процессы памяти, а также уздечку (habenula), регулирующую чувство страха. Две данные структуры являются аналогами гиппокампа и миндалина, соответственно (Fontana, B. D., 2018).

Отмечается также высокая степень гомологии фармакологических мишеней у зебраданио и млекопитающих (Ruuskanen, J. O., 2005; Ruuskanen, J., 2004), включая человека (Ruuskanen, J. O., 2005). Что особенно важно, данные аналогии проявляются и в отношении главных нейротрансмиттерных систем (Kaslin, J., 2006), в том числе, моноаминергических механизмов, включая норадренергическую передачу (Ma, P. M., 1994).

Исследование было выполнено на взрослых особях (5-7 месяцев) зебраданио (*Danio rerio*) дикого короткоплавникового типа (дистрибьютор «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). Все животные, участвовавшие в эксперименте, предварительно не использовались ни в каких других исследованиях. Кормление осуществляли 2 раза в день кормом Тетрамин-Про (Tetra GmbH, Osnabruck, Germany).

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 зебраданию не менялась с порогом <20%) 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 всплытий и время первого всплытия, как описано ранее (Demin, K. A., 2017).

Для дальнейшего изучения механизмов действия мафедина была проведена 3 серия экспериментов (Эксперимент 2) с использованием селективного антагониста альфа-2<sub>c</sub> AP JP 1302 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) в эквимольных количествах 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.

### Изучаемые вещества

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, а также клонидин (АО «Органика», Россия) в дозе 40 мкг/кг.

#### Изучение механизма нейропротекторного действия производного этаноламина

Для исследования механизма действия бис{2-((2E)-4-гидрокси-4-оксбут-2-еноилокси)-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата изучали влияние ФДЭС на нДУВК, поддерживающий стабильность грибовидных шипиков и снижающийся в присутствии Ab. Для оценки нДУВК в постсинаптических компартаментах гиппокампальных нейронов использовали технологию однократной трансфекции генетической конструкции, несущей ген генетически кодируемого кальциевого индикатора. Первичная культура гиппокампа на седьмой день культивирования трансфецировалась плазмидой, экспрессирующей генетически-кодируемый кальциевый индикатор (GEC1) GCamp5.3. На 12-13 день клетки обрабатывали синтетическими Ab42 или оставляли необработанными. Влияние Ab на нДУВК, а также способность исследуемых соединений активировать нДУВК анализировали на 15-16 день. Время инкубации нейронов с исследуемыми соединениями составляло 30 мин при комнатной температуре. Исследуемая концентрация соединений (гиперфорина и ФДЭС) составляла 300нМ.

Для изучения специфичности ФДЭС в активации STIM2-нДУВК был использован метод выключения гена с помощью РНК-интерференции. Для этого гиппокампальная культура на 7-й день ко-трансфецировалась двумя плазмидами. Первая плазида кодировала генетически кодируемый кальциевый индикатор GCamp5.3. Вторая плазида несла ген, кодирующий маленькую интерферирующую РНК (siРНК), выключающую экспрессию гена кана-



ла транзиторного рецепторного потенциала (TRPC6). Кальциевый имиджинг проводили на 15-16 день. Положительным контролем в эксперименте был гиперфорин - известный специфичный активатор каналов TRPC6 (Leuner, K., 2007).

Семейство каналов транзиторного рецепторного потенциала TRPC (Transient Receptor Potential Channels, TRPC), впервые идентифицированных у Дрозофил насчитывает примерно 30 представителей, сгруппированных в 6 субсемейств в зависимости от структурной гомологии: TRPA (анкириновые), TRPC (традиционные, канонические), TRPM (меластатиновые), TRPML (муколиптиновые), TRPP (полицистиновые), и TRPV (ваниллоидные) (Zhang, E., 2015).

Каналы TRP активно вовлечены в механизмы патогенеза многих заболеваний ЦНС. Данные каналы обнаружены как в нейронах, астроцитах, олигодендроцитах и микроглии, так и в клетках эндотелия и гладких мышц сосудов головного мозга (Zhang, E., 2015).

Среди всех каналов TRP для некоторых из них была показана роль в патогенезе ишемического на модели инсульта у крыс (Таблица 5).

Функциональная блокада TRPC 6 приводит к уменьшению выживаемости нейронов после ишемии. На модели временной окклюзии среднемозговой артерии у крыс уровень мРНК данных каналов оставался на прежнем уровне после реперфузии, в то время как уровень белков снижался в результате кальпаин-опосредованного протеолиза (Du, W., 2010). Кальпаины – кальций-зависимые нелизосомальные цистеиновые протеазы. В условиях ишемии избыточные количества  $Ca^{2+}$  поступают в нейроны через NMDA рецепторы, что приводит к началу активации кальпаинов (Goll, D. E., 2003). В связи с этим, разрушение каналов TRPC6 является кальций-зависимым процессом. Поддержание определенного уровня белков данных каналов особенно важно для выживания нейронов в постинсультном периоде за счет CREB сигнального пути (Du, W., 2010) ведущего к усилению образования молекул, обладающих нейропротекторным действием, таких как BDNF и Bcl-2

(Kitagawa, K., 2007). Положительная роль TRPC6 после инсульта подтверждают результаты исследования гиперфорина (Lin, Y., 2013) и ресвератрола, полифенола, содержащегося в некоторых продуктах растительного происхождения (Lin, Y., 2013). Было показано, что данные вещества увеличивают экспрессию TRPC6 и CREB фосфорилирование, в результате чего, у испытуемых животных наблюдалось снижение выраженности неврологического дефицита, а также уменьшение объема зоны инфаркта мозга.

Эксайтотоксичность, вызванная активацией NMDA рецепторов, активно изучалась и изучается в настоящий момент в связи с тем, что избыточное поступление  $Ca^{2+}$  внутрь нейронов является одной из главных причин их последующей гибели. В связи с этим, многие фармакологические исследования были направлены на то, чтобы заблокировать данные рецепторы во время и после ишемии, однако данная стратегия не приносила результата в связи с тем, что NMDA рецепторы в норме выполняют множество физиологических функций и их блокада приводят к значительному числу нежелательных лекарственных реакций (Yu, S. Y., 2013). Поэтому, селективное действие на TRPC6 каналы может быть наилучшим способом регулирования работы NMDA рецепторов, вызывая при этом минимум эффектов на здоровые нейроны, поскольку сокращение числа TRPC6 каналов наблюдается только в ишемизированной зоне головного мозга (Zhang, E., 2015).

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

Таблица 5 – роль TRP каналов в патогенезе инсульта

TRP каналы	Антагонисты	Модель инсульта	Экспрессия после ишемии	Активность после ишемии	Роль в патогенезе ишемии
TRPC3	2-APB, Gd <sup>3+</sup> , La <sup>3+</sup> , SKF96365, рутениевый красный, производное пиперазина Pyg3	Геморрагический инсульт	↑	↑	Астроглиоз
TRPC4	Gd <sup>3+</sup> , La <sup>3+</sup> , ML204, фенаматы	Перманентная ОСМА	↑	?	?
TRPC6	Gd <sup>3+</sup> and La <sup>3+</sup> , клотримазол, 2-APB, GsMTx-4, SKF-96365, норгестимат, соединение 8009-5364	Транзиторная ОСМА	↓	↓	Выживание нейронов
TRPM2	Gd <sup>3+</sup> , La <sup>3+</sup> , фенаматы, клотримазол и экконазол	Транзиторная ОСМА	↑	↑	Противоречивые данные
TRPM4	Спермин, флуфенамовая кислота, хинин, хинидин, АТФ, АДФ, АМФ, 9-фенантрол, глибенкламид	Перманентная ОСМА	↑	↑	Ангиогенез
TRPM7	SKF-96365, 2-APB, вайксеницин А, NS8593, нафамостат мезилат, сфингозин	Транзиторная ОСМА, глобальная ишемия	↑	↑	ФНО-ассоциированный некроптоз
TRPV1	Капсаицин, рутениевый красный, А-425619, IBTU, SB-366791, и AMG 9810	Транзиторная ОСМА	?	?	Терморегуляция
TRPV4	Gd <sup>3+</sup> , La <sup>3+</sup> , цитраль, рутениевый красный, HC-067047, RN-1747, RN-1734, Бутамбен, GSK2193874	Временная глобальная ишемия	↑	↑	Астроглиоз, эксайтотоксичность

Примечание: ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии

## Моделирование черепно-мозговой травмы методом контролируемого кортикального ушиба

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 внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего проводили трепанацию в левой лобной части черепа над зоной сенсомоторной коры (Рисунок 3). 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).

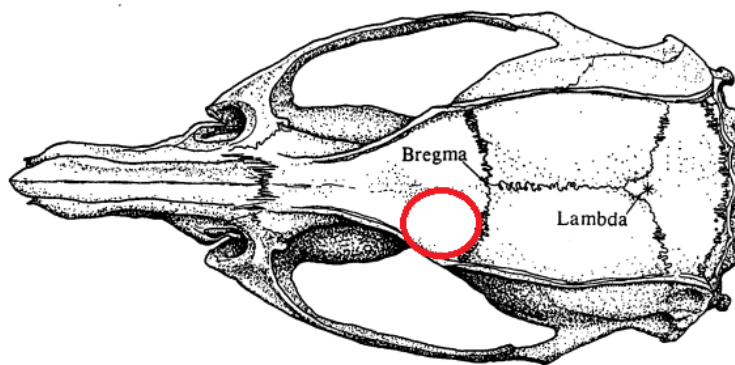


Рисунок 3 – Область трепанации черепа над зоной сенсомоторной коры (Paxinos, G., 2007).

Все лекарственные средства вводили спустя 1 час после нанесения травмы и далее каждый день в одно и то же время в течение 7 дней. Все эксперименты проводили согласно расписанию (Таблица 6).

Таблица 6 – Расписание экспериментов

День травмы	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день	6-й день	7-й день
Утро: ЧМТ ↓ 1 час спустя травмы: введение ЛС	12-00 «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «ОП» ↓ «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «ПКЛ» ↓ «Цилиндр» ↓ «Staircase test» ↓ «Сужающаяся дорожка» ↓ Взятие биоматериала

«ОП» - открытое поле, «ПКЛ» - приподнятый крестообразный лабиринт;

## Поведенческие и функциональные тесты для оценки степени неврологического дефицита у животных после ЧМТ

### Сенсомоторные тесты

Ассоциативная и сенсомоторная области коры, базальные ядра, мозжечок и ствол мозга взаимодействуют между собой, посылая через спинной мозг нисходящие импульсы, оканчивающиеся в скелетных мышцах. Черепно-мозговая травма приводит к нарушению этого взаимодействия и именно поэтому большинство тестов, направленных на оценку степени неврологического дефицита у травмированных животных по своей сути сенсомоторные (Fujimoto, S. T., 2004). Среди таких тестов наиболее известными являются тест «Цилиндр», «Ротарод», тест «Сила хвата», «Skilled forelimb reaching» и «Staircase» тесты, последний так же известный, как тест Монтойа (Montoya, C. P., 1991).

#### Тест «Стимулирование конечностей»

На 1-е, 3-е и 7-е сутки после травмы у животных оценивали выраженность неврологического дефицита в тесте «Стимулирование конечностей», также известном как «Постановка конечности на опору», или, встречающемся в англоязычной литературе, «Limb placing test». Тест заключался в ответе конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию. В ходе тестирования оценивали состояние двигательной функции передней и задней лап в 7 различных испытаниях, результаты выражали в сумме баллов. Для оценки нарушений в работе конечностей использовалась следующая система подсчета: 2 балла – крыса полностью выполняла испытание; 1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой в более чем 2 сек и/или не полностью; 0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности. Максимально возможное суммарное количество баллов было равно 14 (De Ryck, M., 1989).

## Тест «Цилиндр»

В тесте «Цилиндр» оценивали асимметрию использования животным передних конечностей в процессе исследования стенок цилиндра. Для тестирования крысу помещали в цилиндр и проводили видеорегистрацию движений животного в течение 8-10 минут. Просмотр видеозаписи проводили в покадровом режиме, подсчитывая количество независимого использования латеральной и контралатеральной к месту повреждения конечностей во время исследования стенки цилиндра после подъема на задние лапы, а также одновременное (совместное) использование обеих лап. Данные представляли как процент использования контралатеральной конечности от общего числа поведенческих актов по формуле:

$$(\text{контр} + 1/2 \cdot \text{одновр}) / (\text{ипси} + \text{контр} + \text{одновр}) \cdot 100,$$

где контр – контралатеральная к месту повреждения конечность, одновр – одновременное использование передних конечностей, ипси – ипсилатеральная к месту повреждения конечность (Schallert, T., 2000).

## Тест «Сужающаяся дорожка»

Тест «Сужающаяся дорожка» использовали для оценки сенсомоторной функции передних и задних конечностей (Luong, T. N., 2011). Установка представляет собой две сужающиеся дорожки длиной 165 см, расположенные друг под другом, причем нижняя имеет бортики для расположения конечностей животного во время соскальзывания с верхней доски. В конце установки располагается черная коробка, являющаяся конечной целью перемещения животного. Точка старта освещается ярким светом, мотивируя крыс бежать к концу доски в черную коробку. Перед моделированием черепно-мозговой травмы животных в течение 3 дней приучали пересекать «сужающуюся дорожку». Во время тестирования движения крыс записывались на видеокамеру. В покадровом режиме просмотра видео для каждой конечности

отдельно подсчитывали количество постановок конечности на нижнюю доску (ошибок), количество соскальзываний с верхней доски на нижнюю, а также общее количество шагов. Полученные по трем попыткам данные усреднялись, степень выраженности сенсомоторного дефицита рассчитывалась по формуле в процентах:

$$\text{Ошибки} + 0,5 \cdot \text{Соскальзывания} / \text{Общее кол-во шагов} \cdot 100$$

### Тест «Монтойа»

«Staircase test» («Лестничный тест», «тест Монтойа») предложенный Montoya C.P. et al. (Montoya, C. P., 1991) позволяет оценить навыки использования передних конечностей при поедании семечек (или шариков корма), находящихся на различных уровнях двух лестниц, расположенных, соответственно, с левой и с правой стороны относительно животного. Предварительно, за несколько дней до операции крысы ежедневно приучались к установке в течение 15-20 минут. Данная процедура позволяет снизить стрессогенность замкнутого пространства во время тестирования, тем самым увеличить количество съеденного корма, что позволяет более точно оценить функцию передних конечностей. С этой же целью за день до тестирования животные лишались корма (при оставшемся свободном доступе к воде). Длительность теста составляла 20-30 минут, по окончании с каждой стороны подсчитывали количество съеденных семечек. Данные представляли как процент съеденных семечек с контралатеральной к месту травмы стороны к их общему количеству с обеих сторон.

### Эмоционально-поведенческие тесты

Также используются тесты для оценки поведенческих нарушений, так как травма мозга у людей нередко сопровождается эмоционально-поведенческими и психическими расстройствами (Juengst, S. B., 2017; Schwarzbald, M., 2008; Turkstra, L. S., 2015). Тесты для оценки уровня тре-



возности, эмоциональной и исследовательской активности включают в себя «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Открытое поле». Депрессия, как одно из распространенных явлений после ЧМТ (Juengst, S. B., 2017) на данный момент еще не изучена в достаточной степени на животных моделях, однако было проведено несколько исследований с использованием вынужденного плавания для оценки депрессивно-подобного поведения (Jones, N. C., 2005).

#### Тест «Открытое поле»

В тесте «Открытое поле» использовалась видеокomпьютерная регистрация и автоматическая обработка движений животных. Определяли общую двигательную активность (ОДА), складывающуюся из горизонтальных и вертикальных перемещений, груминга и заглядываний в норки, и поисково-исследовательскую активность (ПИА), которую рассчитывали как сумму вертикальных перемещений и заглядываний (Титович, И. А., 2017).

#### Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В тесте ПКЛ у крыс оценивали время нахождения в открытых (ОР) и закрытых рукавах (ЗР), а также ОДА, складывающуюся из количества заходов в темные/светлые рукава, стоек, выглядываний из темных рукавов, свисаний и грумингов (Walf, A. A., 2007).

#### Временные точки тестирования

После того, как модель травмы, вид, порода и пол используемых в предстоящем эксперименте животных определены, необходимо выбрать временные точки тестирования. Здесь важное значение имеет то, что после ЧМТ и животные, и люди показывают некоторое спонтанное восстановление нарушенных функций (Boyeson, M. G., 1994; Nudo, R. J., 2013; Roof, R. L.,

2000), поэтому последствия травмы могут просто-напросто быть незафиксированными, если тестирование проводилось слишком поздно.

С другой стороны, оценивать функциональное состояние животных слишком рано после травмы также нежелательно, поскольку остаточные эффекты от анестезии и хирургических манипуляций могут исказить полученные результаты. Наиболее оптимальным и информативным вариантом является тестирование животных, как в острый, так и в хронический период после травмы. Например, Scherbel U. с коллегами выяснили, что травмированные ФНО-нокаутные мыши показывают лучшее восстановление двигательных функций к исходу первой недели по сравнению с аутбредными мышами, однако спустя некоторое время результат был прямо противоположный (Scherbel, U., 1999). Дополнительно частота проводимых тестов может оказывать влияние на эмоциональное состояние животных, о чем тоже необходимо помнить. И хотя острые временные рамки тестирования важны для изучения молекулярных основ ЧМТ и действия нейропротекторных средств, ключевая цель всех исследований – увеличение длительности и качества жизни пациентов с травмой, поэтому желательно проводить исследование настолько длительно, насколько это позволяют ресурсы.

В Таблице 7 представлены исследования, в которых использовались поведенческие и функциональные тесты на различных моделях ЧМТ.

Хотя все условия не могут быть полностью одинаковыми в разных лабораториях, необходима их максимальная стандартизация для сходимости результатов. Ввиду различий между моделями, животными и местами проведения экспериментов нельзя однозначно сказать, какие тесты наиболее чувствительны в короткий и длительный промежуток времени после травмы. Перед началом эксперимента следует определить, какие методики оценки состояния животных работают наилучшим образом на конкретной модели в конкретной лаборатории.

Таблица 7 – Поведенческие тесты и их временные рамки на различных моделях ЧМТ

Тест	Модель ЧМТ	Тяжесть травмы	Период чувствительности теста после травмы	Литература
«Постановка конечности на опору» («Limb Placing»)	Ударное ускорение	Умеренная	5 недель	(Stibick, D. L., 2001)
	Латеральный жидкостно-перкуSSIONный удар	Умеренная	1 неделя	(Bramlett, H. M., 1995)
«Сужающаяся дорожка» («Beam walking»)	Латеральный жидкостно-перкуSSIONный удар	Умеренная	6 недель	(Lyeth, B. G., 2001)
	Центральный жидкостно-перкуSSIONный удар	Умеренная	8 дней	(Dixon, C. E., 1987)
	Контролируемый кортикальный ушиб	Умеренная	3 дня	(Hamm, R. J., 1992)
	Ударное ускорение	Умеренная	3 дня	(Stibick, D. L., 2001)
«Открытое поле» («Open field»)	Падающий груз	Умеренная	1 неделя	(Воронков, А. В., Шубина, О. С., 2017)
«Приподнятый крестообразный лабиринт» («Elevated plus maze»)	Падающий груз	Умеренная	1 неделя	(Воронков, А. В., 2016)

## Морфологический анализ области травмы

Для определения объема очага повреждения по окончанию взятия спинномозговой жидкости у крыс извлекали головной мозг и фиксировали его в течение суток в 10% забуференном формалине. На вибротоме (Camden Instruments Ltd., Великобритания) осуществляли серийные срезы мозга с шагом 100 мкм. Каждый второй срез последовательно монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Германия) и окрашивали раствором крезилвиолета. Далее препараты обезвоживали 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 ( $\text{мм}^3$ ) 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);  $S_n$ ,  $\text{мм}^2$  – измеренная площадь повреждения в срезе;  $\Sigma$  – сумма площадей повреждений в срезах (Isaev, N. K., 2012).

Гистологический материал обезжиривали 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 эвтаназировали введением двойной дозы хлоралгидрата. Взятие спинномозговой жидкости из *cisterna magna* осуществля-

ли методом, описанным Nirogi R. et al. (Nirogi, R., 2009). Далее ликвор центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин, забирали верхний надосадочный слой и замораживали при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего анализа.

После однократного размораживания образца спинномозговой жидкости производили определение белка по методу Lowry О.Н. (Lowry, О. Н., 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 дисперсион-

ного анализа ANOVA с пост-хок тестом по Тьюки, а при ненормальном распределении - 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 ненормальным распределением – с помощью U-критерия Манна-Уитни.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Участие различных подтипов альфа-2 адренорецепторов в локомоции на модели децеребрированной кошки

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

##### *Механическая стимуляция хвоста*

При локомоции, вызванной механической стимуляцией хвоста, введение селективных антагонистов альфа-2 адренорецепторов не приводило к достоверному изменению углов суставов по сравнению с исходным уровнем. Аналогично, длительность опоры и переноса, а также суммарная длительность цикла шага оставались неизменными после введения данных веществ.

Антагонист альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов ARC 239 увеличивал максимальную длину опоры задней конечности во время локомоции у всех кошек, в среднем, на 27,6% по сравнению с исходным уровнем (Рисунок 4).

Введение антагониста альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов JP 1302 приводило к уменьшению длины переноса коленного сустава на 27,2%, 15,1% и 47,2% у кошек 20, 21 и 22, соответственно (Рисунок 5).

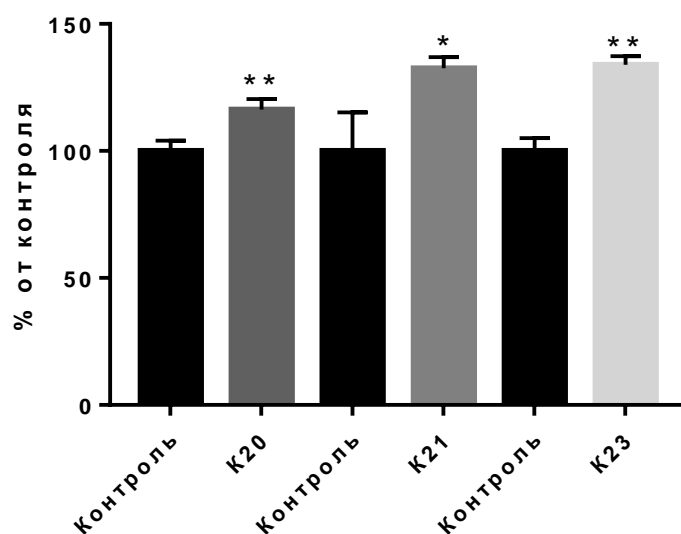


Рисунок 4 – Максимальная длина опоры задней конечности кошек после введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста при локомоции, вызванной механической стимуляцией хвоста. \*p <0.05, \*\*p <0.01

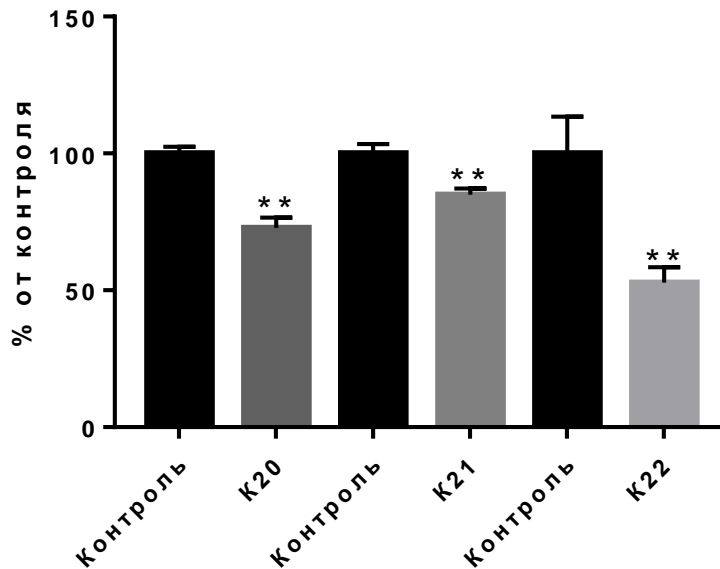


Рисунок 5 – Длина переноса коленного сустава кошек после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при локомоции, вызванной механической стимуляцией хвоста. \*\*p <0.01

### *Эпидуральная стимуляция*

Во время локомоции, вызванной эпидуральной электростимуляцией, у кошек, которым вводили антагонист альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов JP 1302, уменьшался угол разгибания голеностопного сустава в фазу E3 по сравнению с исходным уровнем, в среднем, на 9,4% (Рисунок 6), все остальные параметры оставались на прежнем уровне.

### *Эпидуральная стимуляция+пассивное движение передних лап*

Антагонист альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов ARC 239 у всех кошек увеличивал разгибание коленного сустава в среднем на 17,0% (Рисунок 7) и голеностопного сустава на 17,5% (Рисунок 8) в фазу F локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап по сравнению с начальным уровнем. Так же у испытуемых животных данное соединение уменьшало высоту подъ-



ема коленного сустава на 42,31% (Рисунок 9), длительность фазы переноса на 22,0% (Рисунок 10) и высоту подъема кончика стопы на 38,6% (Рисунок 11).

Антагонист альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов JP 1302 уменьшал максимальную длину опоры на 46,3%, 14,6% и 41,9% у кошек 20, 21 и 22, соответственно (Рисунок 12).

В целом, введение альфа-2<sub>A</sub> антагониста не оказывало значимого эффекта 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.

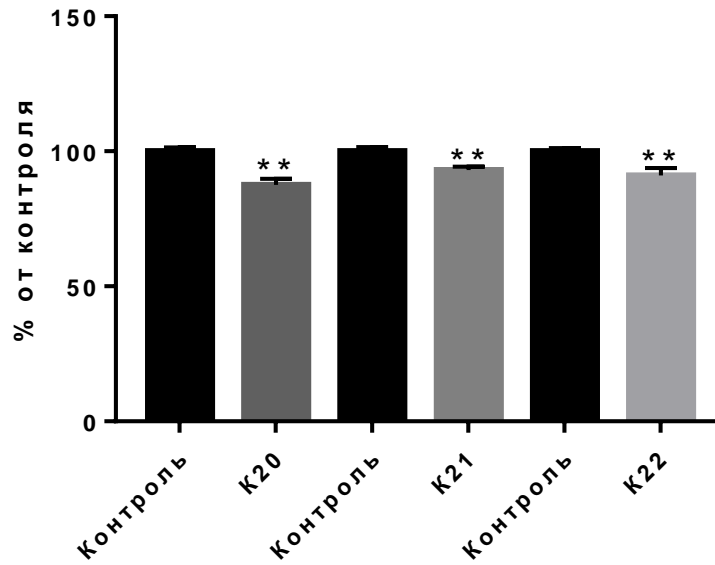


Рисунок 6 – Угол голеностопного сустава кошек в фазу E3 шага после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС. \*\*p<0.01

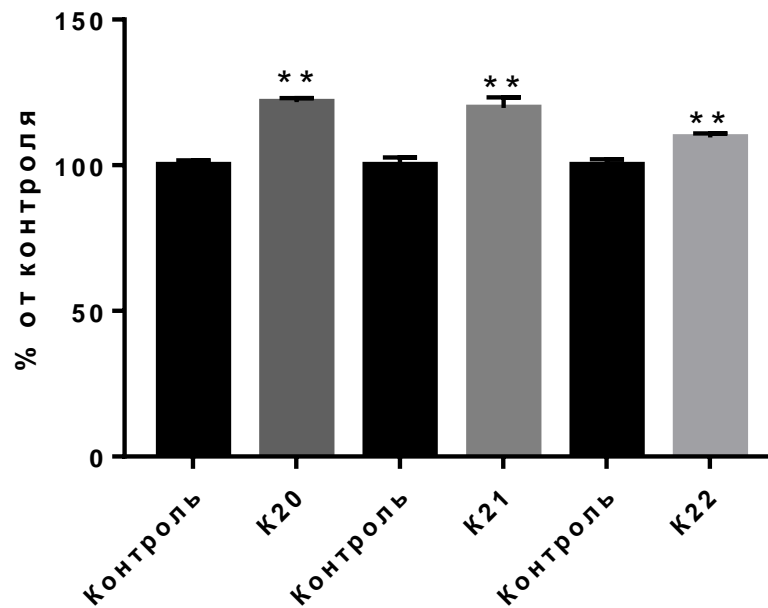


Рисунок 7 – Угол коленного сустава кошек в фазу F шага после введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p<0.01

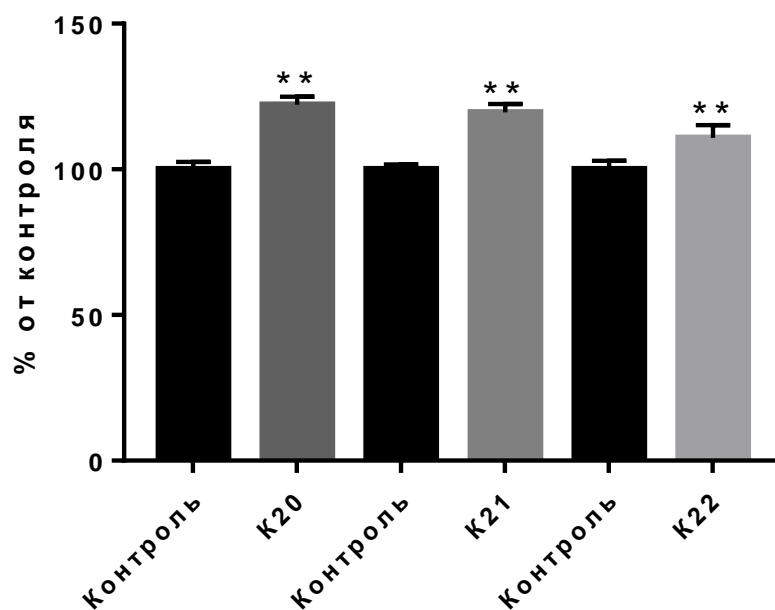


Рисунок 8 – Угол голеностопного сустава кошек в фазу F шага после введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p<0.01

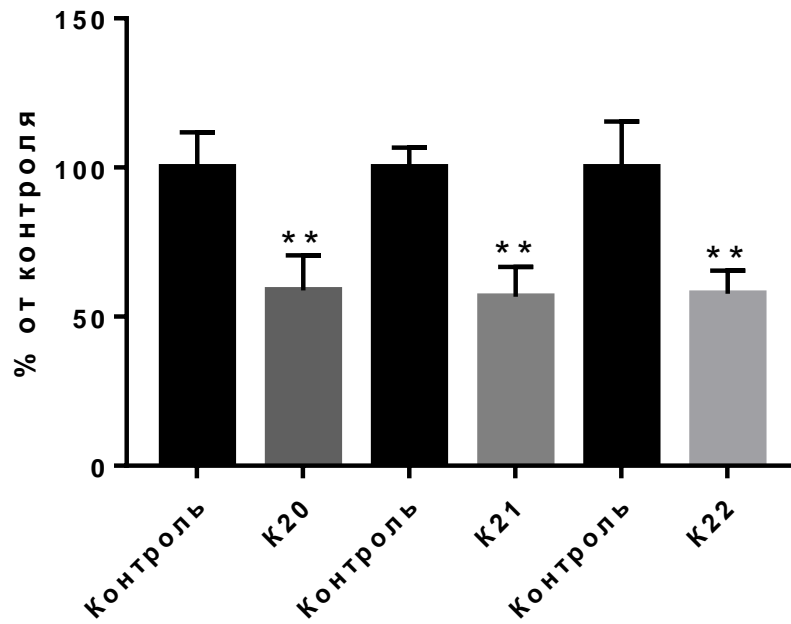


Рисунок 9 – Высота подъема коленного сустава кошек в фазу F шага после введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\* $p < 0.01$

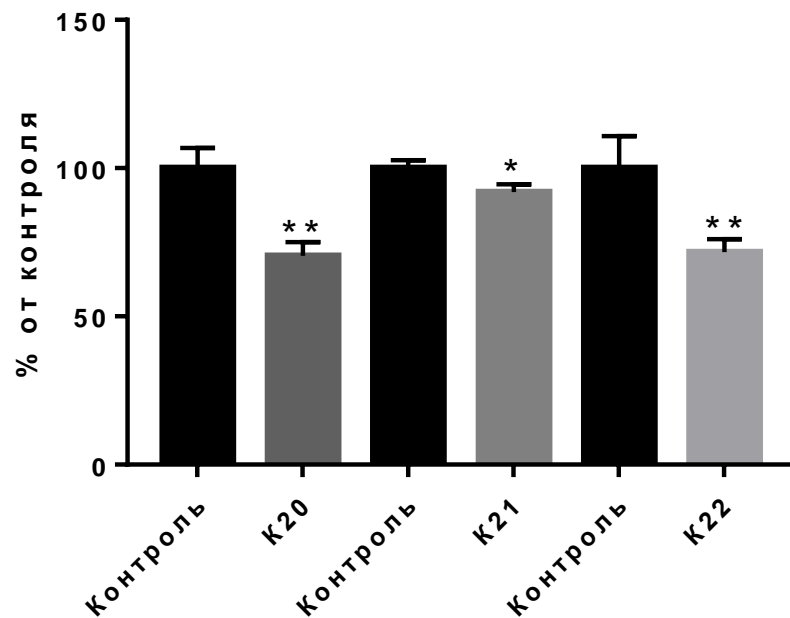


Рисунок 10 – Длительность фазы переноса шага после введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\* $p < 0.01$

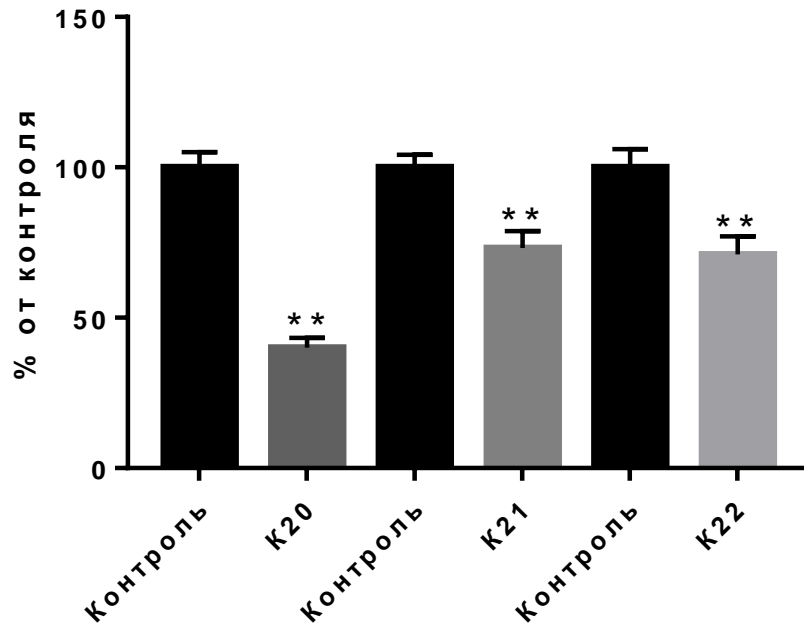


Рисунок 11 – Высота подъема кончика стопы в фазу F после введения альфа- $2_B$  антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап.  $**p < 0.01$

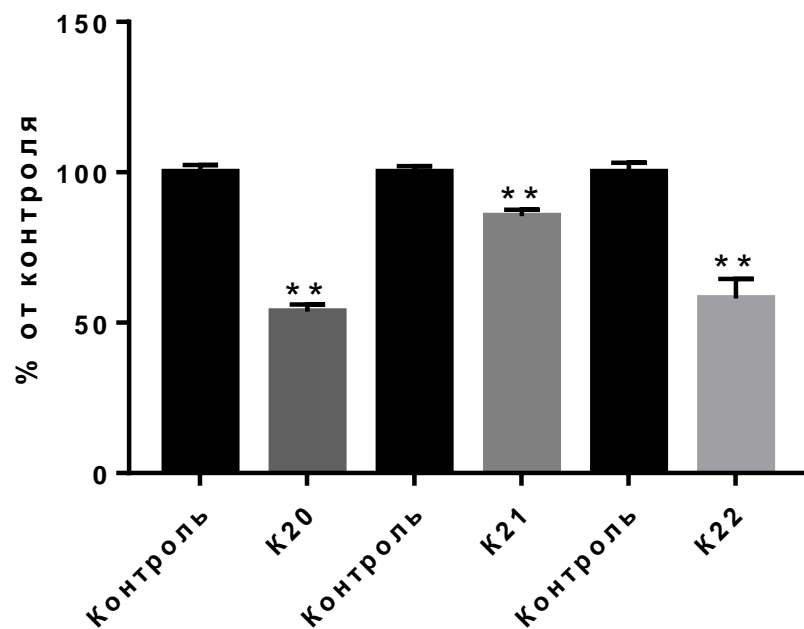


Рисунок 12 – Максимальная длина опоры задней конечности после введения альфа- $2_C$  антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап.  $**p < 0,01$

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

#### *Механическая стимуляция хвоста*

Введение антагониста альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов приводило к увеличению площади под кривой ТА L на 21,6%, 56,6% и 86,5% у кошек 20, 21 и 23, соответственно, что свидетельствует об усилении активности данной мышцы (Рисунок 13).

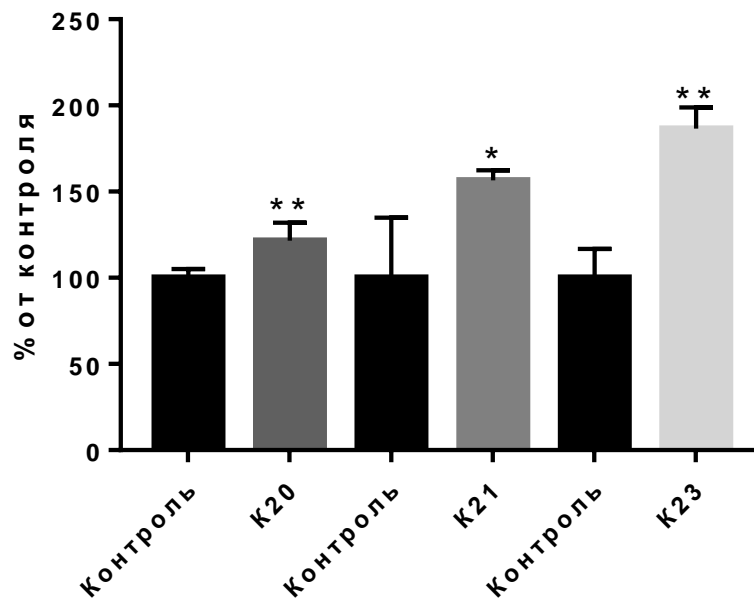


Рисунок 13 – Площадь под кривой мышцы ТА L после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при локомоции, вызванной механической стимуляцией хвоста. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$

#### *Эпидуральная стимуляция*

Антагонист альфа-2<sub>A</sub> рецепторов у всех кошек уменьшал максимальную амплитуду пачек ТА R в среднем на 21,3% (Рисунок 14) и увеличивал максимальную амплитуду пачек мышцы VL L на 122,9%, 107,5% и 245,7% у 20, 21 и 22 кошки (Рисунок 15).

Введение антагониста альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов приводило к увеличению длительности пачек мышцы TA R на 19,1%, 28,3% и 145,2% у кошек 20, 21 и 22, соответственно (Рисунок 16). Также уменьшалась максимальная амплитуда пачек MG R на 98,5% у кошки 20, на 14,8% у кошки 21 и на 65,1% у кошки 22 (Рисунок 17) и VL L, в среднем, на 57,6% у всех кошек (Рисунок 18). Кроме того, уменьшалась площадь под кривой пачек мышц MG L на 85,0%, 29,2% и 88,2% (Рисунок 19) и MG R на 88,7%, 38,9% и 88,3% у кошек 20, 21 и 22, соответственно. (Рисунок 20).

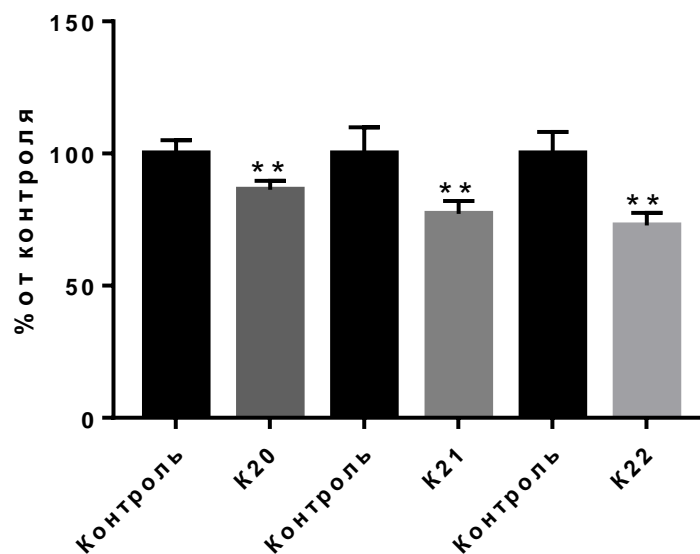


Рисунок 14 – Максимальная амплитуда пачек мышцы TA R после введения альфа-2<sub>A</sub> антагониста при ЭС локомоции. \*\*p <0,01

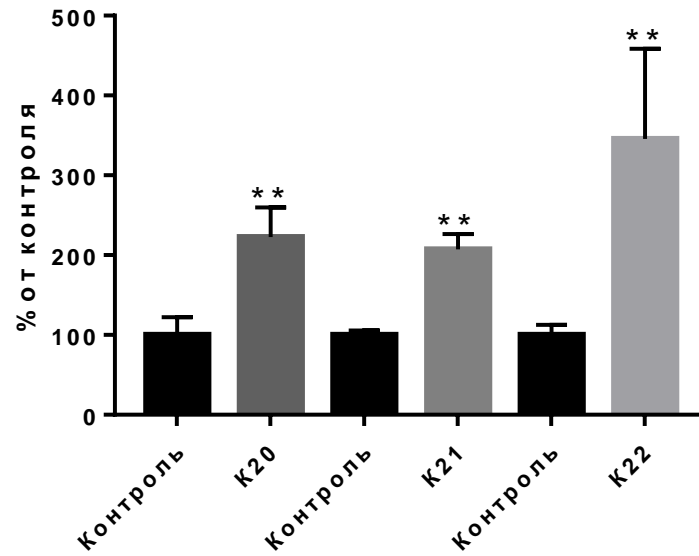


Рисунок 15 – Максимальная амплитуда пачек мышцы VL L после введения альфа-2<sub>A</sub> антагониста при ЭС локомоции. \*\* $p < 0,01$

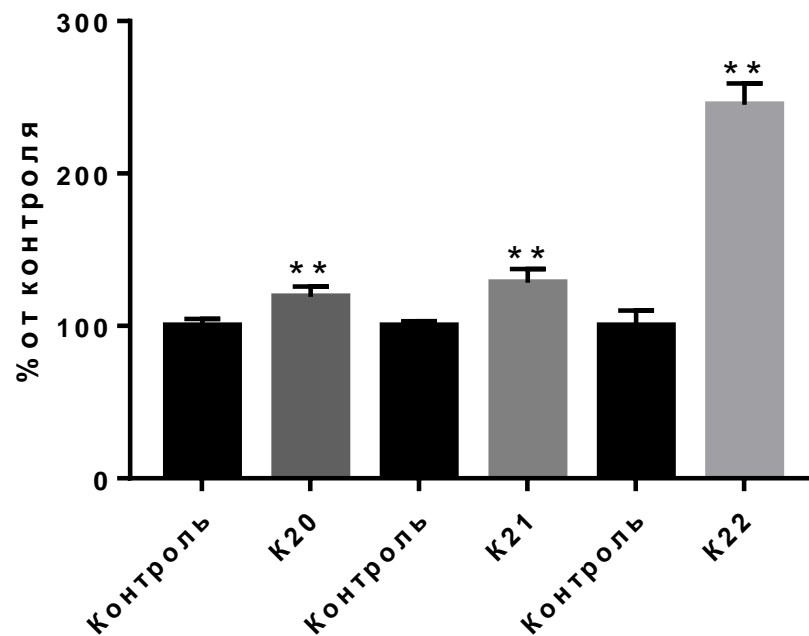


Рисунок 16 – Максимальная амплитуда пачек мышцы TA R после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при ЭС локомоции. \*\* $p < 0,01$



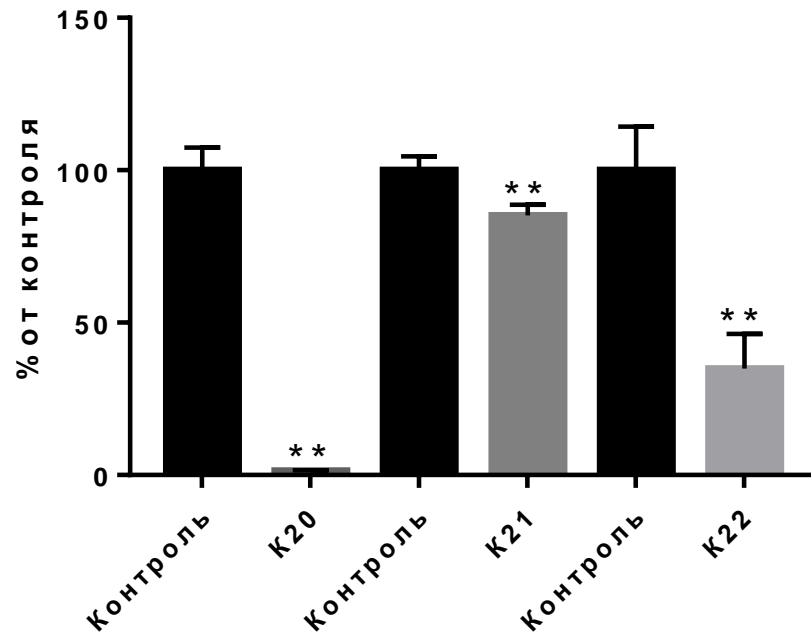


Рисунок 17 – Максимальная амплитуда пачек мышцы MG R после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при ЭС локомоции. \*\*p < 0,01

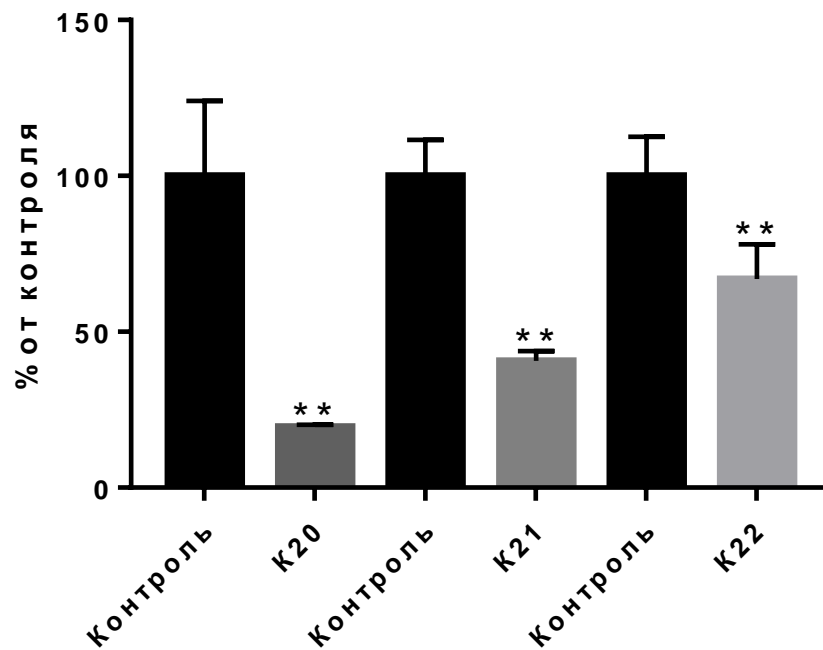


Рисунок 18 – Максимальная амплитуда пачек мышцы VL L после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при ЭС локомоции. \*\*p < 0,01

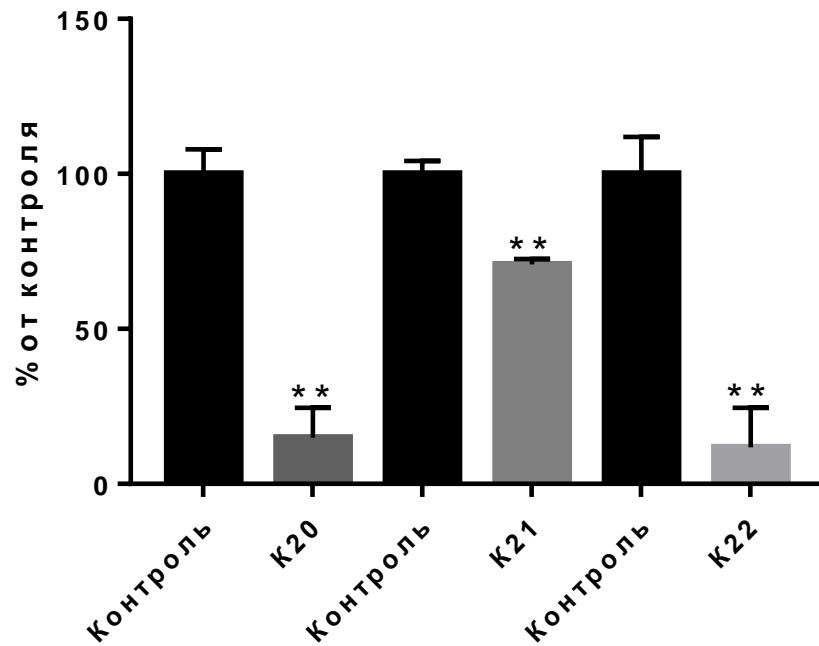


Рисунок 19 – Площадь под кривой пачек мышцы MG L после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при ЭС локомоции. \*\*p < 0,01

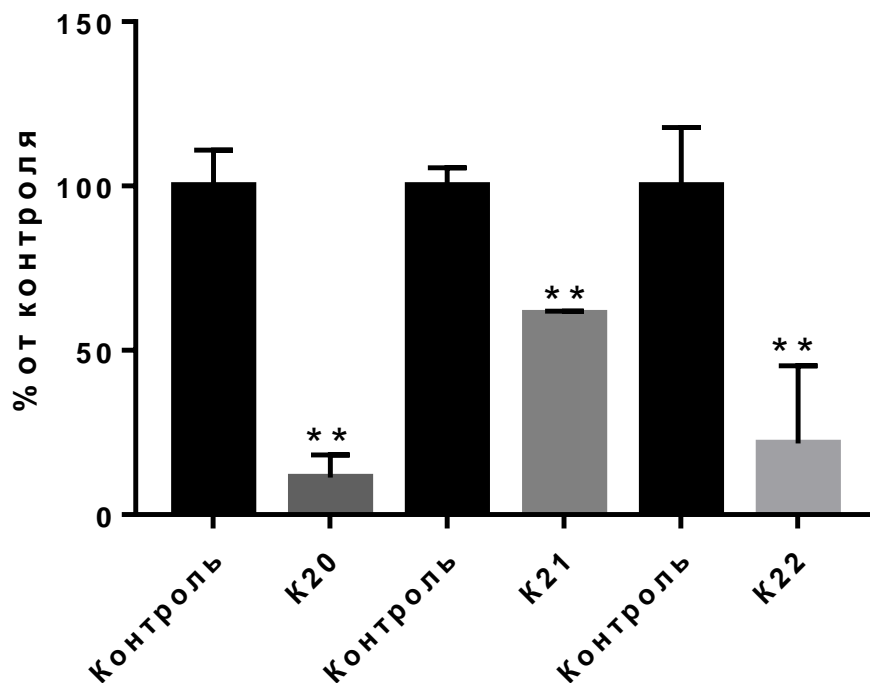


Рисунок 20 – Площадь под кривой пачек мышцы MG R после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при ЭС локомоции. \*\*p < 0,01

### Эпидуральная стимуляция+пассивное движение передних лап

Введение антагониста альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов приводило к уменьшению максимальной амплитуды мышц MG L, в среднем, на 65,5% (Рисунок 21) и MG R на 46,7% (Рисунок 22) у всех кошек. Так же блокада альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов приводила к уменьшению площади под кривой пачек VL R на 57,6% (Рисунок 23).

Введение кошкам антагониста альфа-2<sub>C</sub> рецепторов приводило к уменьшению максимальной амплитуды (Рисунок 24), площади под кривой пачек (Рисунок 25), а также увеличению длительности межпачечного интервала (Рисунок 26) пачек мышцы MG L. Также данный антагонист увеличивал у испытуемых животных длительность межпачечного интервала мышцы VL L (Рисунок 27).

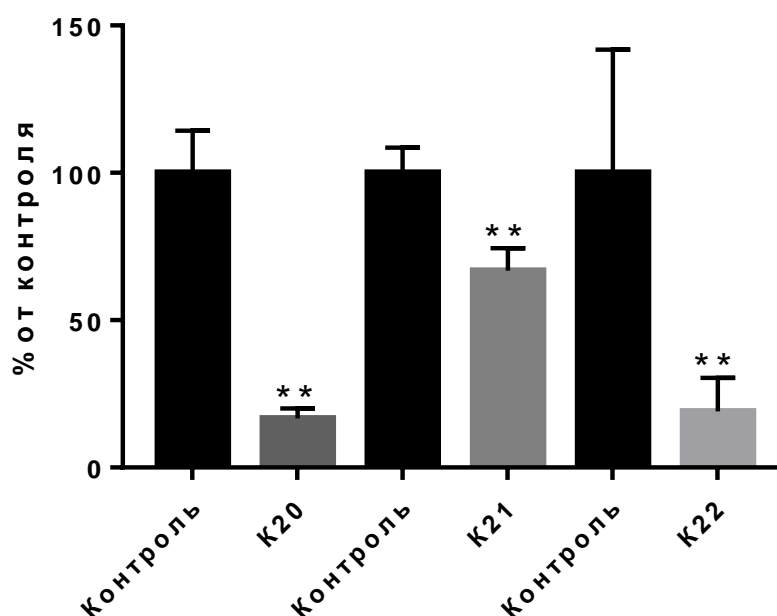


Рисунок 21 – Максимальная амплитуда пачек мышцы MG L после введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p < 0,01

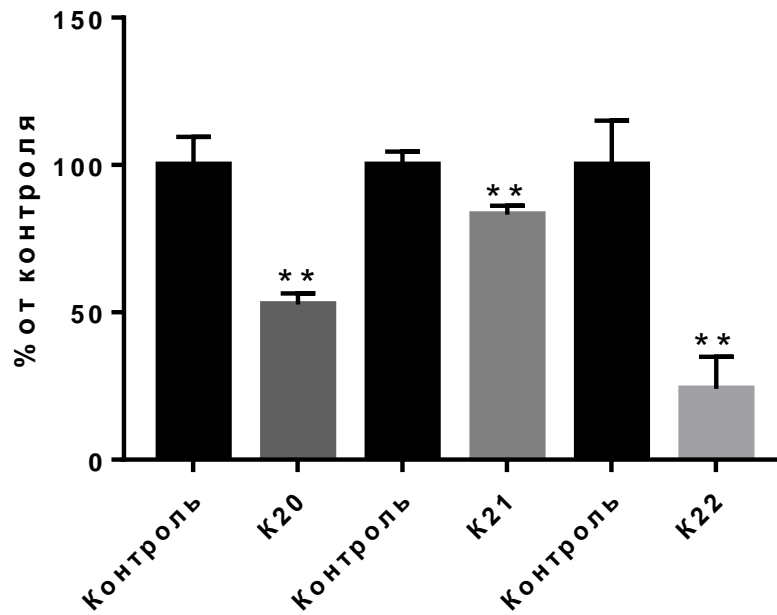


Рисунок 22 – Максимальная амплитуда пачек мышцы MG R после введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p < 0,01

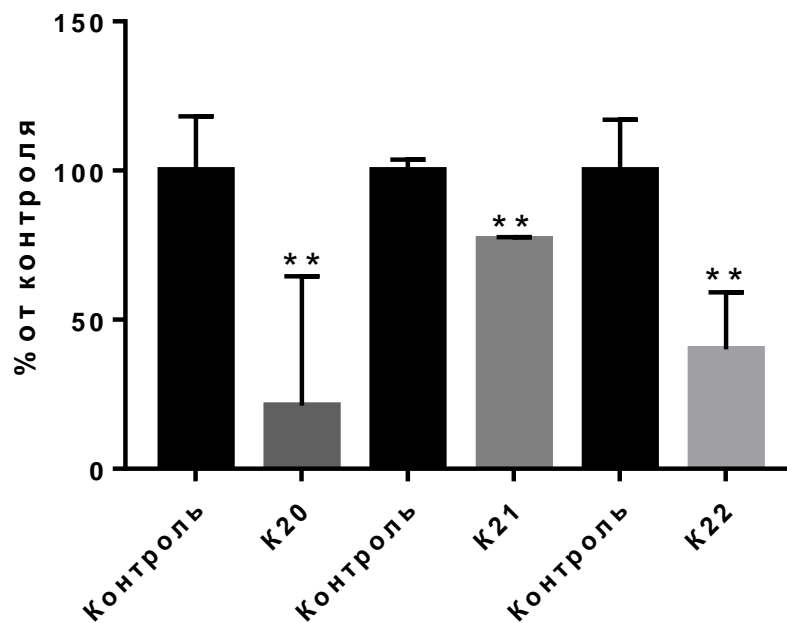


Рисунок 23 – Площадь под кривой пачек мышцы VL R после введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p < 0,01

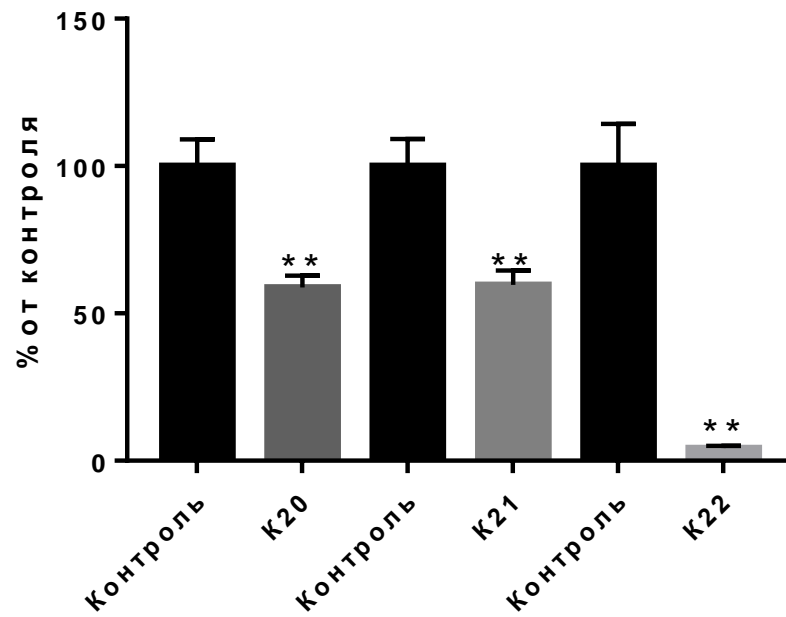


Рисунок 24 – Максимальная амплитуда пачек мышцы MG L после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p < 0,01

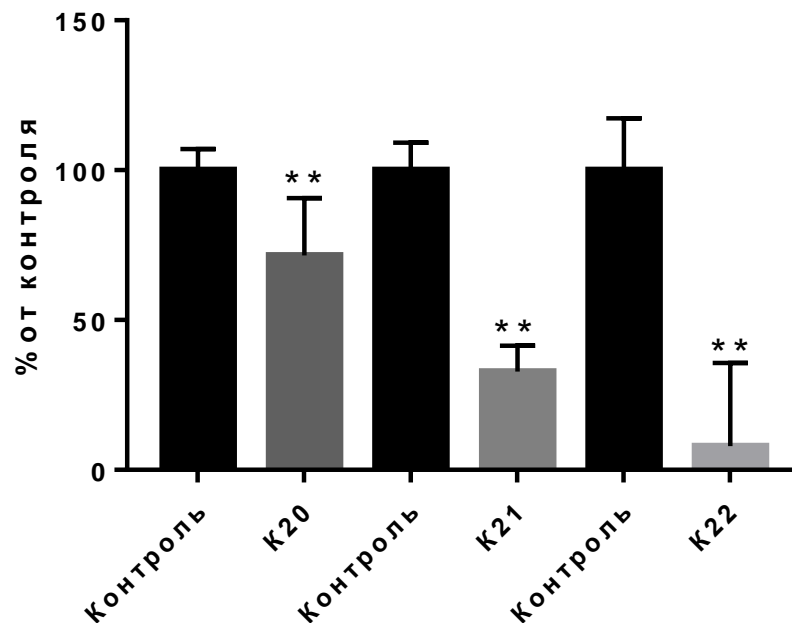


Рисунок 25 – Площадь под кривой пачек мышцы MG L после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p < 0,01

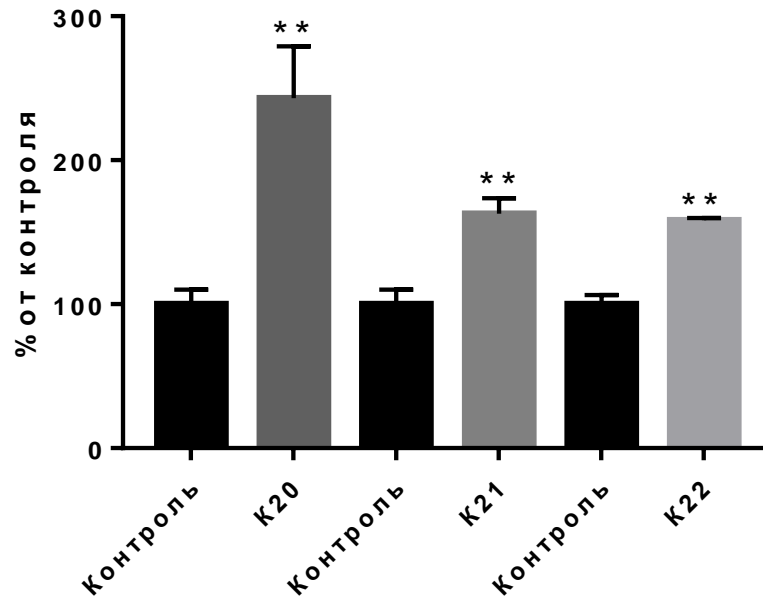


Рисунок 26 – Длительность межпачечного интервала пачек мышцы MG L после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p < 0,01

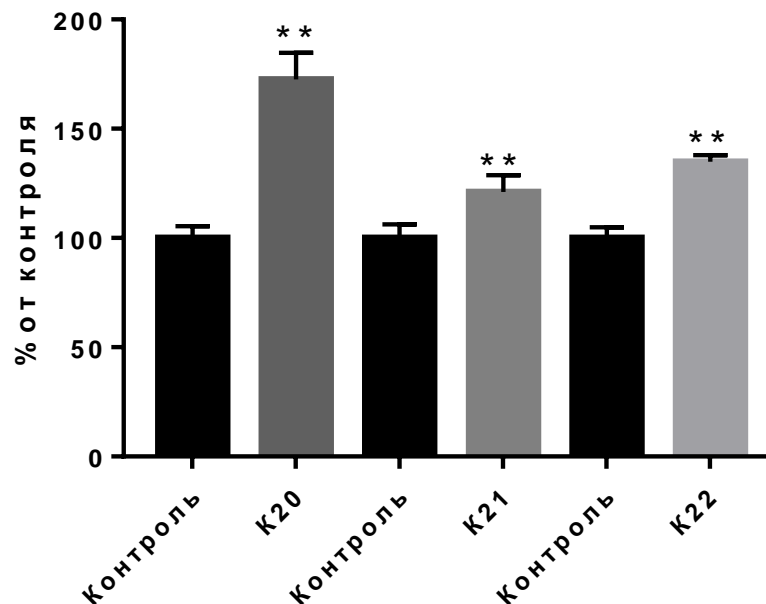


Рисунок 27 – Длительность межпачечного интервала пачек мышцы VL L после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста при локомоции, вызванной ЭС и пассивным движением передних лап. \*\*p < 0,01

Подводя итоги анализа миографической активности децеребрированных кошек при разных видах локомоции, можно подытожить, что введение антагониста альфа-2<sub>A</sub> адренорецепторов не оказывало значимого влияния на большинство анализируемых параметров, поскольку, у разных кошек наблюдалась разнонаправленность эффектов, однако, при локомоции, вызванной ЭС, у всех испытуемых животных наблюдалось уменьшение активности мышц-флексоров при противоположном увеличении активности 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.

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.

### 3.1.3 Влияние 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 (Рисунок 28) и MG R, в среднем, на 59,0% и 65,4%, соответственно (Рисунок 29).

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 наблюда-

лось достоверное снижение величины ответа мышц MG R, в среднем, на 96,4% (Рисунок 30) и VL R на 88,0% (Рисунок 31) по сравнению с исходным уровнем.

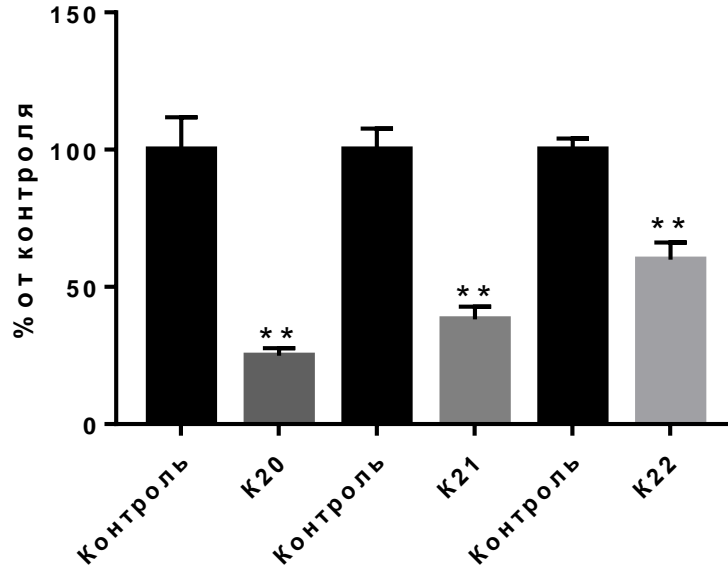


Рисунок 28 – Амплитуда ранних ответов (3-30 мс) мышцы TA R при стимуляции током 100 мкА после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста \*\*p < 0,01

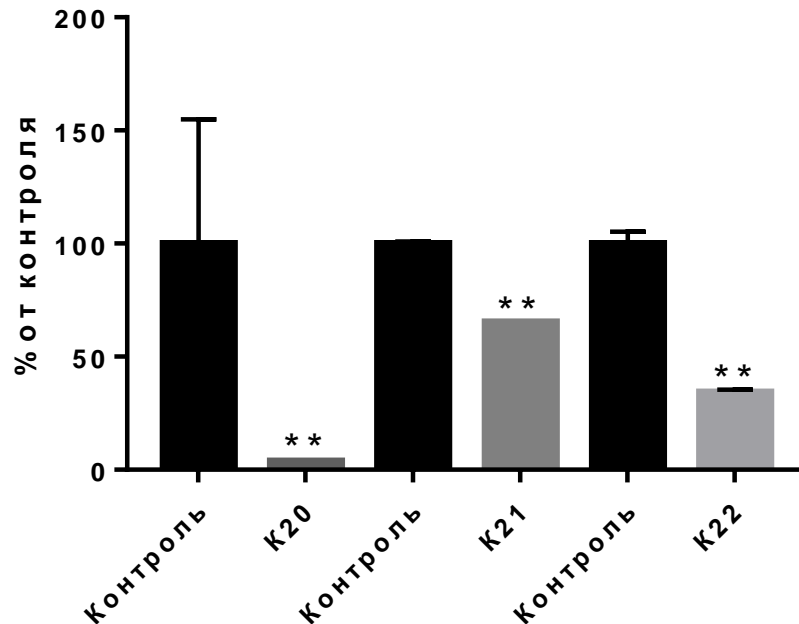


Рисунок 29 – Амплитуда ранних ответов (3-30 мс) мышцы MG R при стимуляции током 100 мкА после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста \*\*p < 0,01



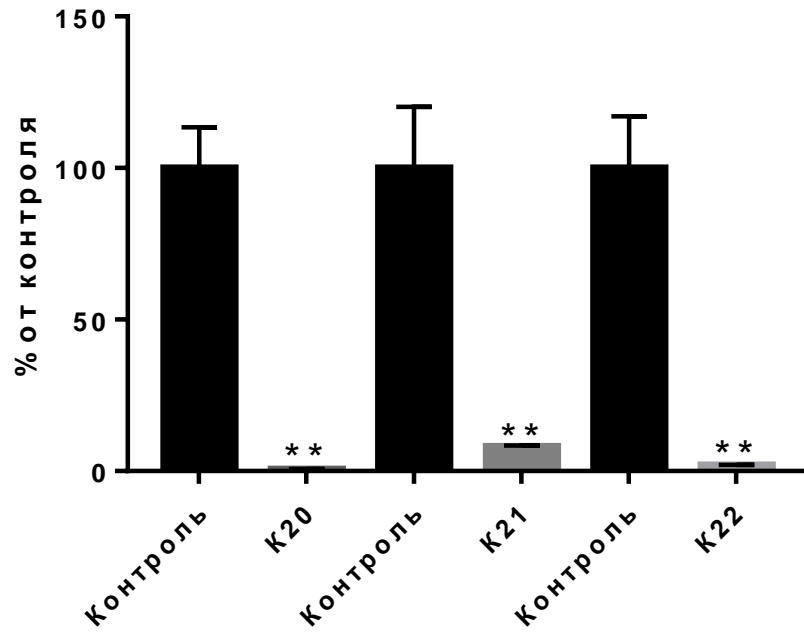


Рисунок 30 – Амплитуда поздних ответов (30-100 мс) мышцы MG R при стимуляции током 100 мкА после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста \*\*p <0.01

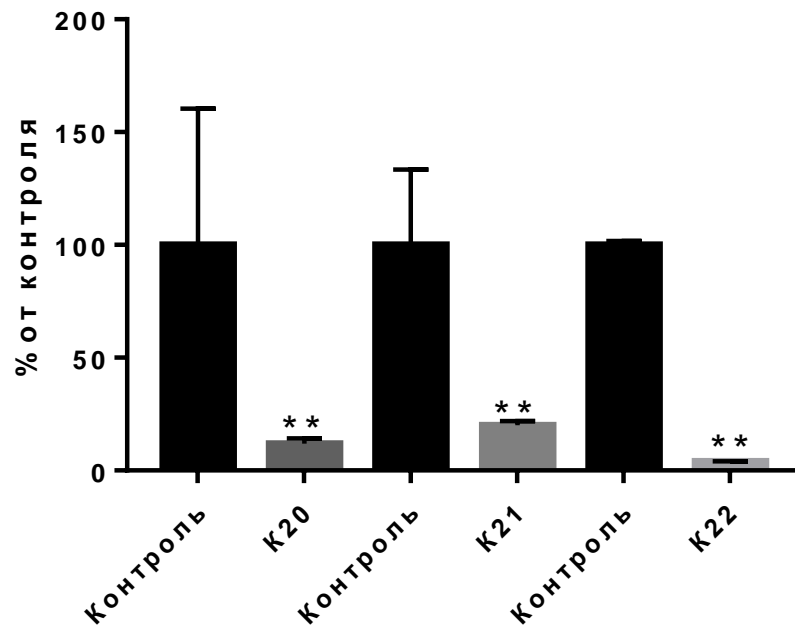


Рисунок 31 – Амплитуда поздних ответов (30-100 мс) мышцы VL R при стимуляции током 100 мкА после введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста \*\*p <0.01

Таким образом, антагонисты альфа-2<sub>A</sub> и альфа-2<sub>B</sub> рецепторов не оказывали влияние на амплитуды вызванных потенциалов мышц при токе 100 мкА, при котором у децеребрированных кошек при ЭС возникает локомоция. Введение антагониста альфа-2<sub>C</sub> рецепторов уменьшало амплитуды ранних и поздних ответов мышц, что свидетельствует о том, что ухудшалось проведение возбуждения по моно- и полисинаптическим рефлекторным путям.

В проведенных исследованиях впервые изучали роль подтипов альфа-2 адренорецепторов в модуляции локомоции. Было продемонстрировано, что введение избирательных антагонистов альфа-2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub> и 2<sub>C</sub> адренорецепторов приводит к специфическим изменениям кинематических и миографических параметров, а также мышечного ответа вызванных потенциалов. Несмотря на то, что альфа-2 адренорецепторы широко представлены во многих отделах спинного мозга, в данных экспериментах было продемонстрировано, что при разных видах локомоции, в зависимости от причины инициации шагательных движений, блокирование одних и тех же подтипов альфа-2 адренорецепторов по-разному влияет на регистрируемые параметры. Можно предположить, что данная особенность связана тем, что при различных видах локомоции, в зависимости от способа ее вызова, альфа-2 адренорецепторы действуют через различные анатомические структуры и нейронные сети. Следовательно, наблюдаемый эффект, также может отличаться между локомоциями.

Введение антагониста альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов приводило к увеличению максимальной длины опоры при локомоции, вызванной механической стимуляцией хвоста в то время как при локомоции, вызванной эпидуральной электростимуляцией при одновременно пассивном движении передних лап – к увеличению углов разгибания голеностопного и коленного суставов, а также высоты подъема коленного сустава в F фазу. Поскольку шагательные движения при стимуляции хвоста вызываются за счет импульсов от афферентных волокон от кожных механорецепторов (волокна II по Ллойду-Ханту), и, также, вероятно, от немиелинизированных афферентов боли (волокна IV по Ллойду-Ханту), а при эпидуральной стимуляции – от волокон Ia,

I<sub>b</sub> и II, можно предположить, что именно волокна IV (афференты боли) опосредуют эффект увеличения максимальной длины опоры при локомоции, вызванной механической стимуляцией хвоста. Данное утверждение вполне согласуется с литературными данными: было показано, что альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторы опосредуют антиноцицептивный эффект альфа-2 агонистов (Leonard, M. G., 2016) (равно как и альфа-2<sub>A</sub> рецепторы) (Sudo, R. T., 2017), а волокна IV отвечают именно за проведение болевого импульса.

При локомоции, вызванной эпидуральной стимуляцией хвоста и пассивным движением передних лап, активируются не только волокна I и II, но также и проприоспинальные связи как с роstralными сегментами спинного мозга, так и, в целом, с вышележащими отделами ЦНС. При введении антагониста альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов увеличение углов разгибания голеностопного и коленного суставов, а также снижение высоты подъема коленного сустава и кончика стопы в фазу F может быть следствием изменения работы проприоспинальных связей. И хотя проприоспинальные связи располагаются, в основном, в белом веществе спинного мозга, а альфа-2 адренорецепторы обнаружены только в сером веществе, как у людей, так и у кошек, крыс (Smith, M. S., 1995), регуляция данных связей альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторами может осуществляться за счет VIII и X пластин серого вещества спинного мозга (Таблица 8).

Таким образом, влияние альфа-2<sub>B</sub> адренорецепторов на локомоцию может быть обусловлено модуляцией афферентных импульсов волокон IV, а также изменением работы проприоспинальных связей серого вещества спинного мозга.

Таблица 8 – Эффекты введения альфа-2<sub>B</sub> антагониста на локомоцию и ВП

	Механическая стимуляция хвоста	Эпидуральная стимуляция	Эпидуральная стимуляция+ пассивное движение передних лап
Нервные волокна	Aβ и C - кожные механорецепторы и немиелинизированные волокна боли	Aα и Aβ - первичные афферентные волокна мышечных веретен и от сухожильных органов Гольджи, вторичные афферентные волокна мышечных веретен	Проприоспинальная стимуляция+Aα и Aβ - первичные афферентные волокна мышечных веретен и от сухожильных органов Гольджи, вторичные афферентные волокна мышечных веретен
Кинематика	↑длина опоры		↑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		↓максимальной амплитуды MG L, ↓максимальной амплитуды MG R, ↓площади под кривой VL R
ВП			

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.

Несмотря на то, что точная локализация подтипов альфа-2<sub>C</sub> рецепторов в пределах спинного мозга кошки не описана, скорее всего, она имеет сходство с двумя представленными видами. С одной стороны, можно предположить, что на телах мотонейронов IX пластин спинного мозга кошки располагаются альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторы, введение антагонистов которых будет снижать активность мышц, участвующих в локомоции. Однако, в таком случае, агонисты альфа-2 адренорецепторов должны были бы повышать тонус скелетных мышц и никак не могли бы использоваться в качестве спазмолитических или миорелаксирующих средств (Zygmunt, M., 2015). Кроме того, в классическом понимании, альфа-2 адренорецепторы располагаются преимущественно пре- нежели постсинаптически. Следовательно, другим и наиболее возможным вариантом может быть то, что альфа-2<sub>C</sub> рецепторы расположены пресинаптически на тормозных интернейронах, угнетающих активность мотонейронов вентральных рогов спинного мозга. Таким образом, наиболее вероятно, что альфа-2<sub>C</sub> антагонист JP 1302 действуя пресинаптически на соответствующие рецепторы, увеличивал выброс интернейронами медиаторов, оказывающих тормозное действие на мотонейроны, и, соответственно, на скелетные мышцы. Данное предположение аргументируется результатами анализа вызванных потенциалов. При введении JP 1302 уменьшалась амплитуда поздних ответов (30-100 мс), т.е., полисинаптических, именно тех, в реализацию которых вовлечены не только эфферентные и эфферентные волокна, но также и вставочные нейроны.

Наиболее стабильным эффектом среди антагонистов альфа-2 адренорецепторов обладал именно антагонист альфа-2<sub>C</sub> рецепторов JP 1302 (Таблица 9). Данное соединение уменьшало амплитуду и площадь под кривой пачек многих сгибателей и разгибателей при всех видах локомоции, в независимости от того, чем были вызваны шагательные движения. В отличие от других альфа-2 адренорецепторов, рецепторы C-подтипа имеют более локализованное расположение в пределах спинного мозга. Описано, что у людей данный подтип рецепторов представлен только в поясничной области серого веще-

ства спинного мозга (Smith, M. S., 1995), а у крыс по всей его протяженности, но преимущественно в области вентральных корешков (Rosin, D. L., 1996).

Таблица 9 – Эффекты введения альфа-2<sub>C</sub> антагониста на локомоцию и ВП

	Механическая стимуляция хвоста	Эпидуральная стимуляция	ЭС + пассивное движение передних лап
Нервные волокна	A $\beta$ и C - кожные механорецепторы и немиелинизированные волокна боли	A $\alpha$ и A $\beta$ - первичные афферентные волокна мышечных веретен и от сухожильных органов Гольджи, вторичные афферентные волокна мышечных веретен	Проприоспинальная стимуляция + A $\alpha$ и A $\beta$ - первичные афферентные волокна мышечных веретен и от сухожильных органов Гольджи, вторичные афферентные волокна мышечных веретен
Кинематика	↓длины переноса коленного сустава	↓угла голеностопного сустава в фазу ЕЗ	↓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		

### 3.2 Изучение механизма действия мафедина

Поскольку у зебраданио норадренергическая система в ЦНС имеет сходство с грызунами и человеком (Ma, P. M., 1994), и было показано, что у данного вида в головном и спинном мозге экспрессируются аналогичные подтипы альфа-2 адренорецепторов (Ruuskanen, J. O., 2005), данную биологическую модель использовали для оценки избирательности рецепторного действия мафедина.

Начальным этапом работы на зебраданио был подбор дозы, при которой у рыб будут фиксироваться достоверные изменения поведения в тесте «Новый аквариум» (Рисунки 32-38). 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 (Рисунок 32). Также по сравнению с контролем средний угол поворота у группы мафедина был в 1,7 раза ниже (Рисунок 34). Мафедин вызывал у экспериментальных рыб достоверное увеличение времени нахождения в нижней части бассейна (Рисунок 36). По сравнению с контролем, у группы мафедина была в 1,4 раза увеличена частота состояния низкой мобильности (Рисунок 35) и в 2,3 раза снижена длительность замирания (Рисунок 32). Таким образом, доза 60 мг/л была выбрана оптимальной для дальнейшего исследования.



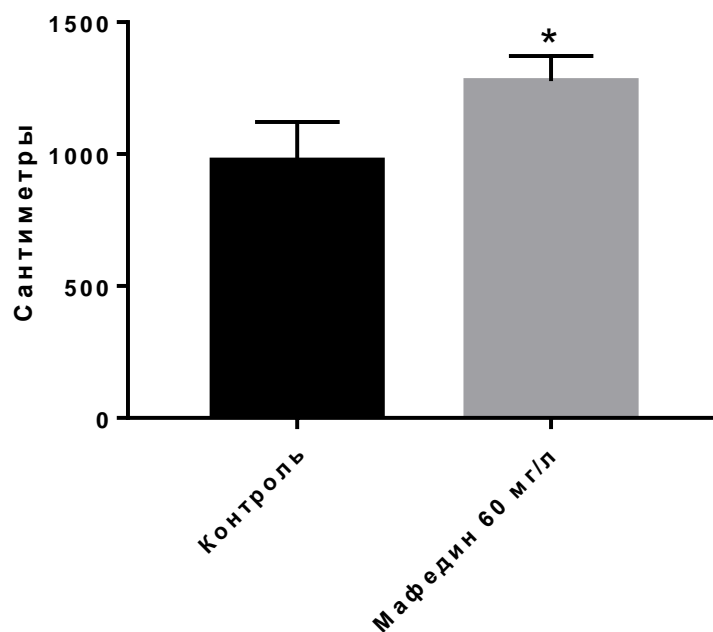


Рисунок 32 – Влияние мафедина на длину проплытой дистанции зебраданио в тесте НА (Эксперимент 1). \* $p < 0,05$ , по критерию Манна-Уитни.

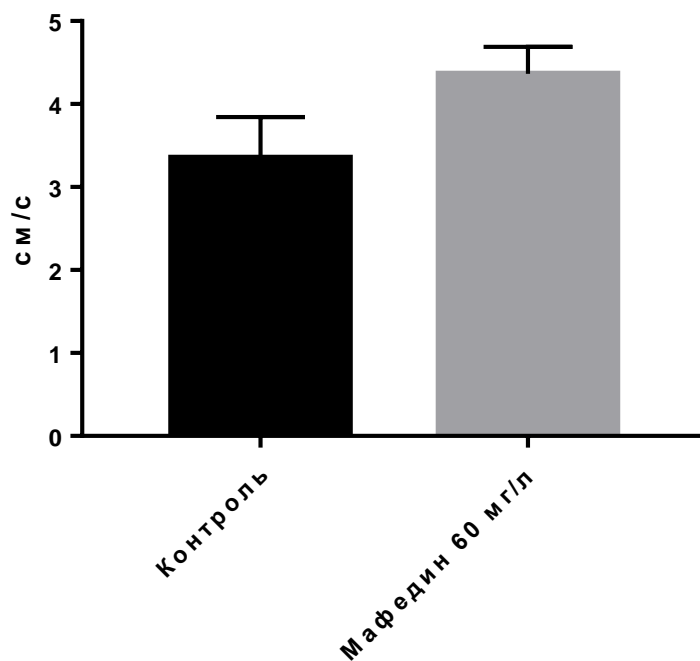


Рисунок 33 – Влияние мафедина на среднюю скорость зебраданио в тесте НА (Эксперимент 1).

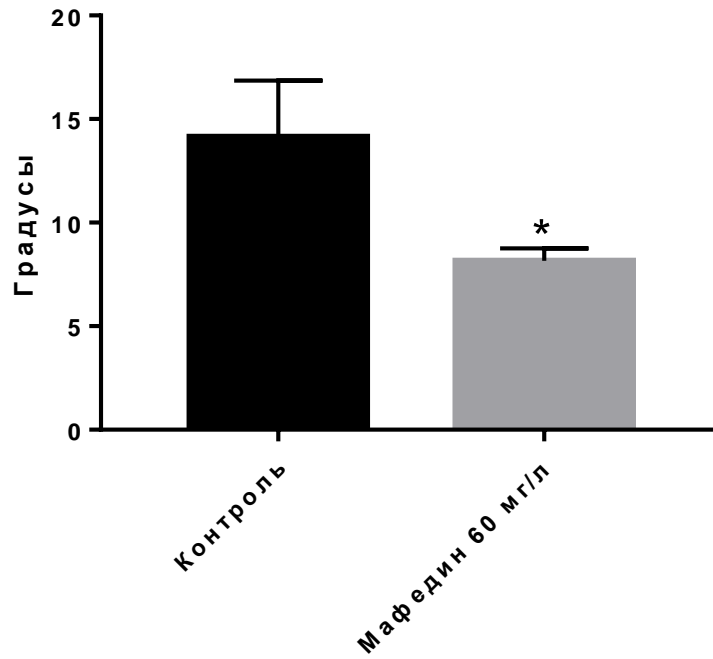


Рисунок 34 – Влияние мафедина на величину среднего угла поворота зебр-данио в тесте НА (Эксперимент 1). \* $p < 0,05$ , по критерию Манна-Уитни.

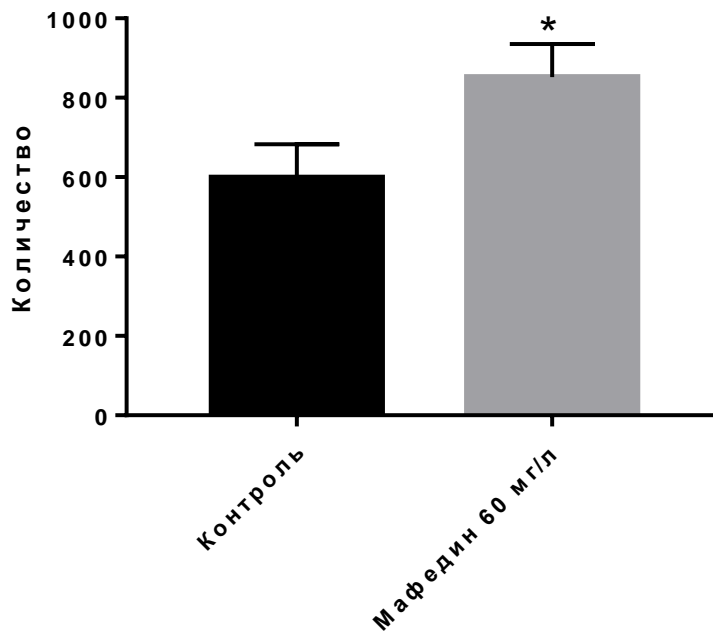


Рисунок 35 – Влияние мафедина на частоту возникновения состояния низкой мобильности зебр-данио в тесте НА (Эксперимент 1). \*  $p < 0,05$ , по критерию Манна-Уитни.

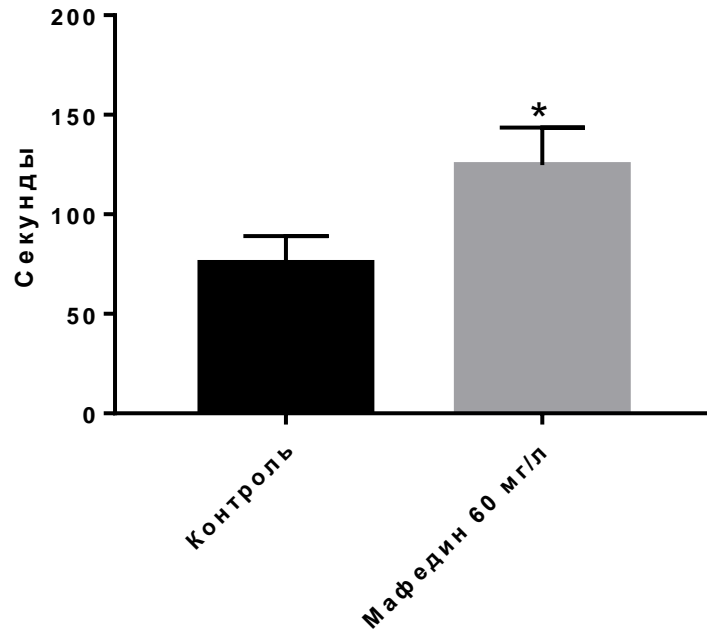


Рисунок 36 – Влияние мафедина на время нахождения в нижней части бассейна зебраданио в тесте НА (Эксперимент 1). \*  $p < 0,05$ , по критерию Манна-Уитни.

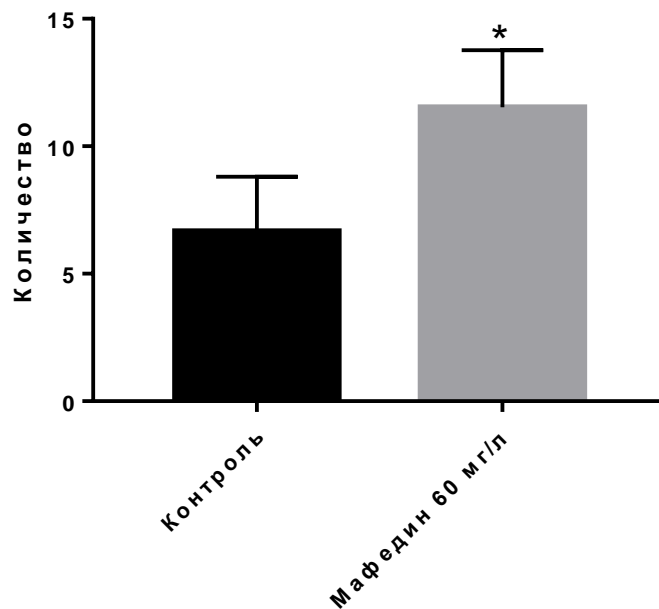


Рисунок 37 – Влияние мафедина на частоту всплытий в верхнюю часть бассейна зебраданио в тесте НА (Эксперимент 1). \*  $p < 0,05$ , по критерию Манна-Уитни.

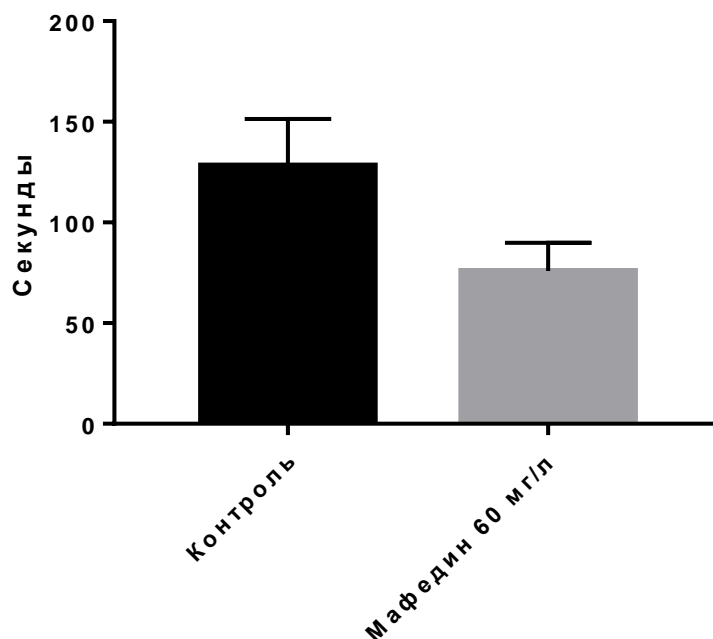


Рисунок 38 – Влияние мафедина на время первого всплытия в верхнюю часть бассейна зебраданию в тесте НА (Эксперимент 1).

Следующим этапом работы была оценка вклада альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов в наблюдаемые ранее эффекты мафедина на поведение зебраданию в тесте «Новый аквариум». В Эксперименте 2 сравнивались поведенческие показатели рыб 3 экспериментальных групп: контрольной, группы мафедина в дозе 60 мг/л и группы, которой одновременно с мафедином вводился антагонист альфа-2<sub>C</sub> адренорецепторов JP 1302 (Рисунки 39-50). В данном эксперименте мафедин в дозе 60 мг/л приводил к статистически значимому увеличению количества ускорений (Рисунок 43) и количества всплытий (Рисунок 49) по сравнению с контрольной группой, в то время как время нахождения в нижней части танка снижалось по сравнению с контролем (Рисунок 48). В группе, которая получала мафедин одновременно с JP 1302, количество ускорений было ниже по сравнению с группой мафедина (Рисунок 43), и эта группа находилась больше времени в нижней части танка по сравнению с рыбами, получавшими мафедин (Рисунок 48)

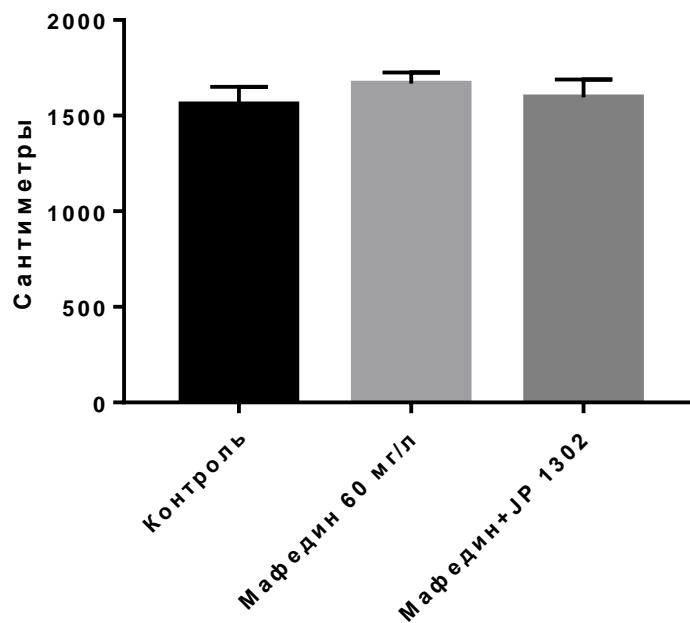


Рисунок 39 – Влияние мафедина и JP 1302 на длину проплытой дистанции зебраданио в тесте НА (Эксперимент 2).

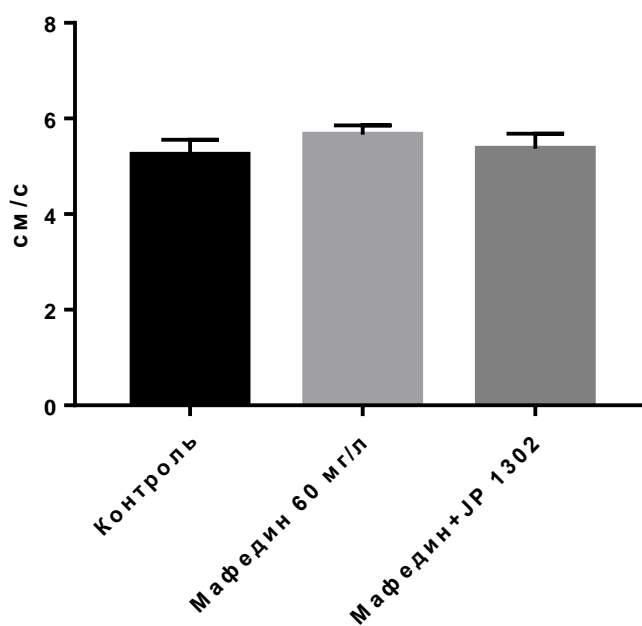


Рисунок 40 – Влияние мафедина и JP 1302 на среднюю скорость зебраданио в тесте НА (Эксперимент 2).

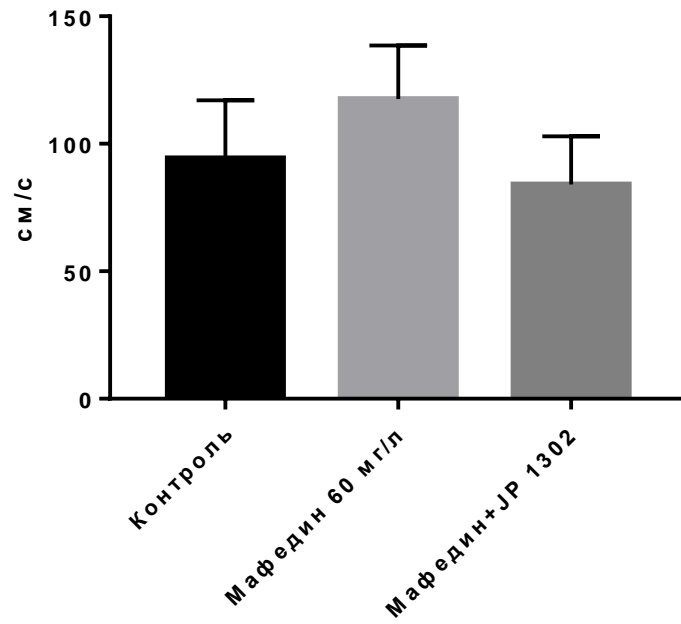


Рисунок 41 – Влияние мафедина и JP 1302 на максимальную скорость зebра-данио в тесте НА (Эксперимент 2).

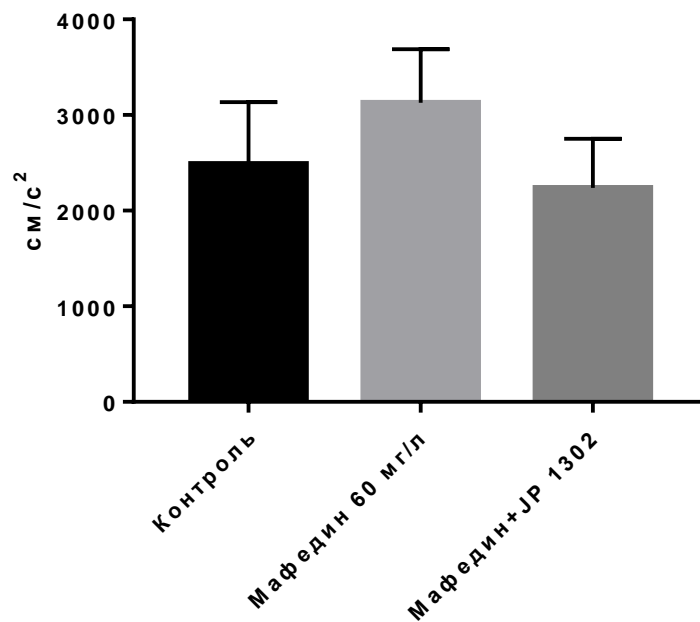


Рисунок 42 – Влияние мафедина и JP 1302 на максимальное ускорение зebра-данио в тесте НА (Эксперимент 2).

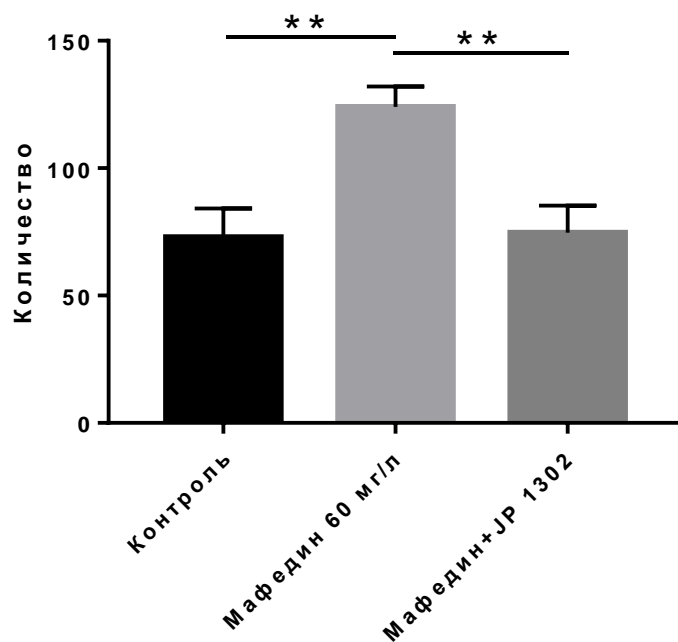


Рисунок 43 – Влияние мафедина и JP 1302 на количество ускорений зебрада-  
нию в тесте НА (Эксперимент 2). \*\*  $p < 0,01$ , по критерию Крускала-  
Уоллиса.

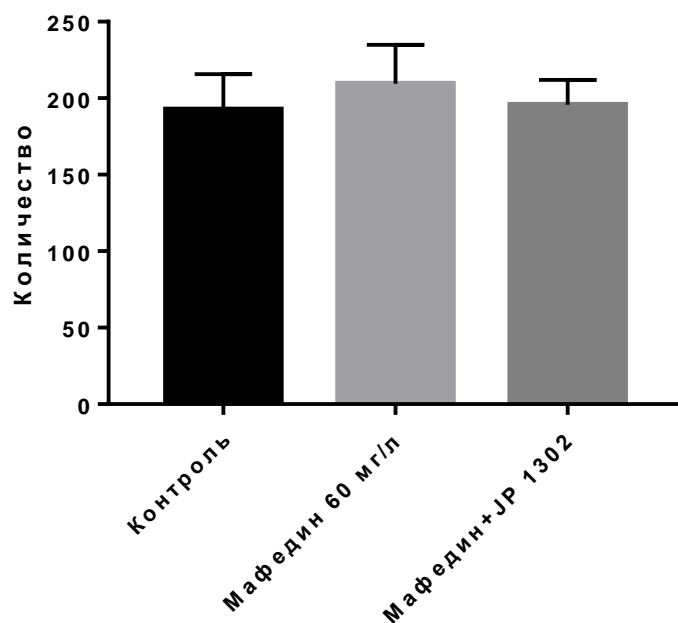


Рисунок 44 – Влияние мафедина и JP 1302 на количество замираний зебрада-  
нию в тесте НА (Эксперимент 2).

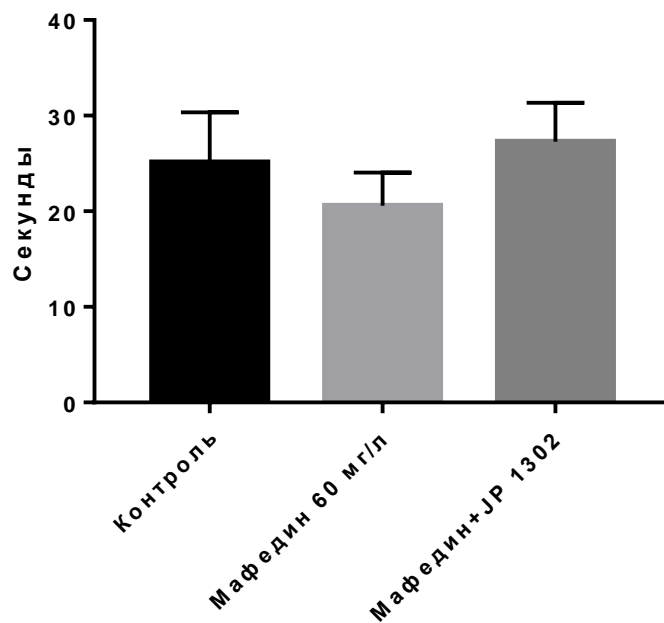


Рисунок 45 – Влияние мафедина и JP 1302 на общее время замираний зевраданио в тесте НА (Эксперимент 2).

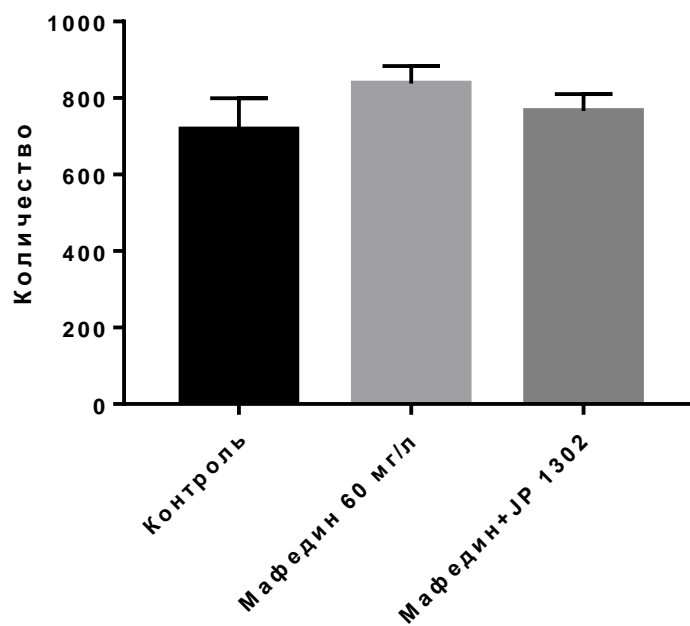


Рисунок 46 – Влияние мафедина и JP 1302 на частоту состояния низкой мобильности зевраданио в тесте НА (Эксперимент 2).



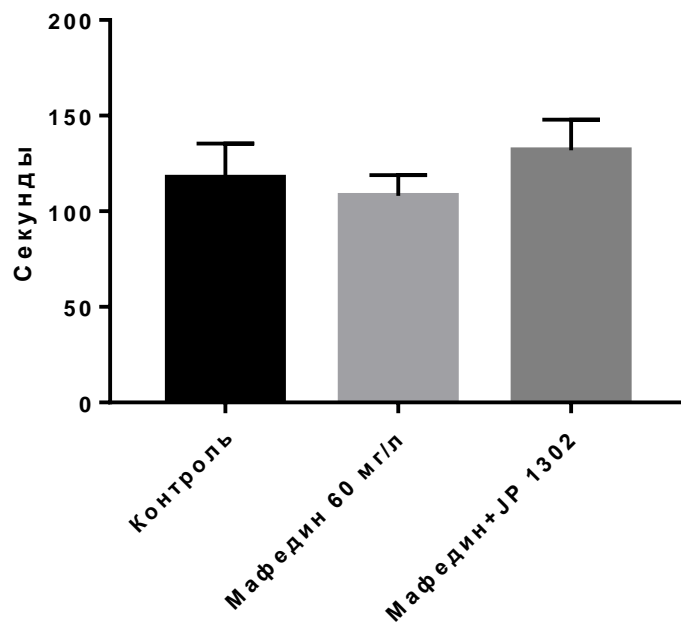


Рисунок 47 – Влияние мафедина и JP 1302 на длительность состояния низкой мобильности зебраданио в тесте НА (Эксперимент 2).

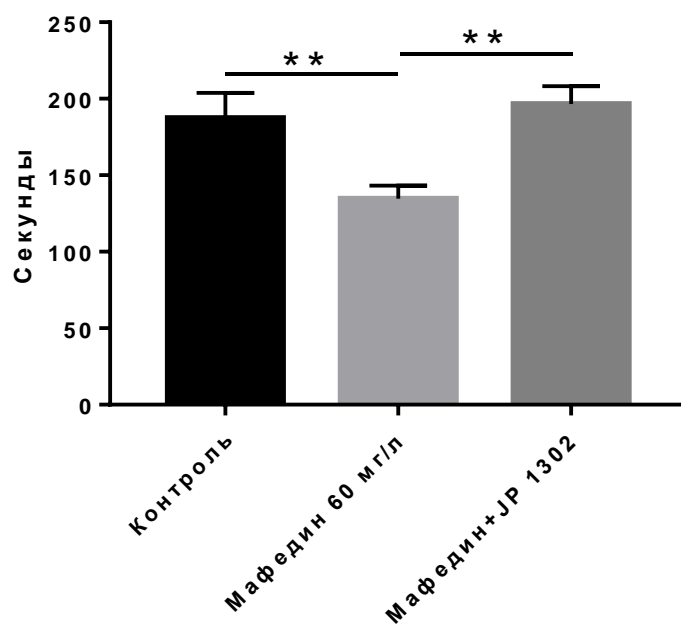


Рисунок 48 – Влияние мафедина и JP 1302 на время нахождения зебраданио в нижней части бассейна в тесте НА (Эксперимент 2). \*\*  $p < 0,01$ , по критерию Крускаля-Уоллиса.

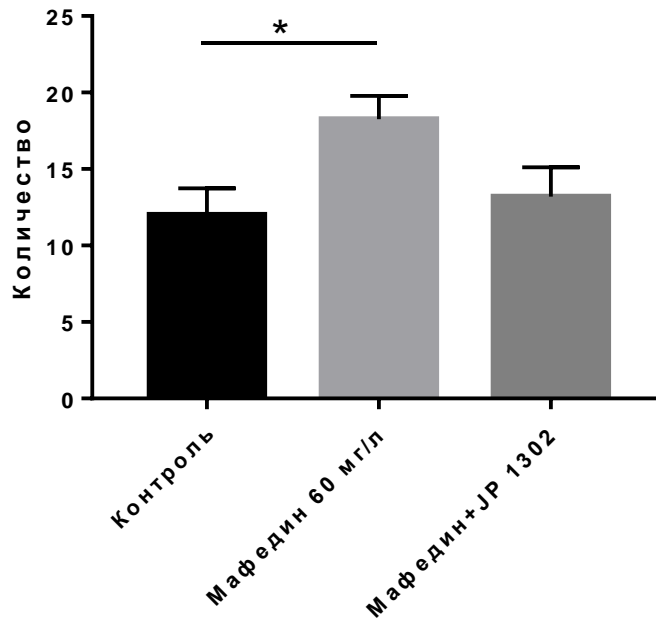


Рисунок 49 – Влияние мафедина и JP 1302 на количество всплываний в верхнюю часть бассейна зебр аданио в тесте НА (Эксперимент 2). \*  $p < 0,05$ , по критерию Крускаля-Уоллиса.

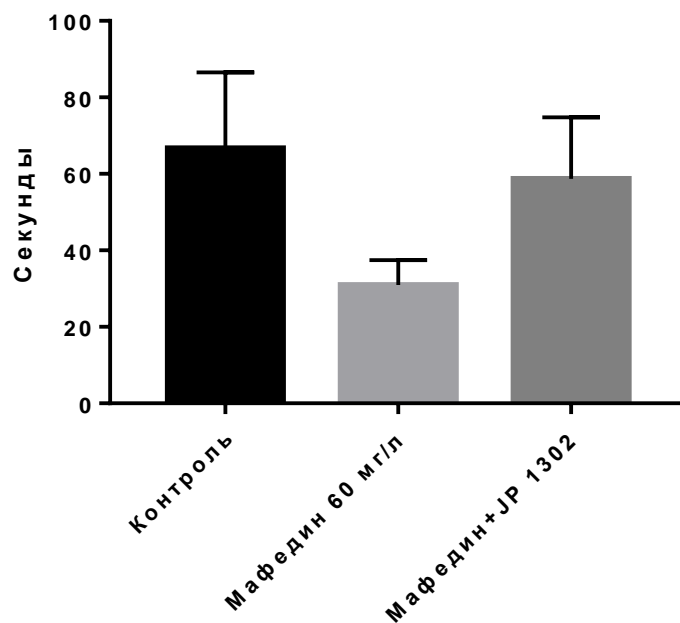


Рисунок 50 – Влияние мафедина и JP 1302 на время первого всплывания в верхнюю часть бассейна зебр аданио в тесте НА (Эксперимент 2).

Также представлялось интересным оценить действие мафедина на поведение зебраданио в тесте «Новый аквариум» при длительном введении (Рисунки 51-66). В эксперименте 4 7-дневное введение мафедина в дозе 1 мг/л приводило к достоверному увеличению длительности (Рисунок 62) и частоты возникновения состояния высокой мобильности (Рисунок 61) 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 (Рисунок 59). Повышение дозы до 5 и 10 мг/л приводило к увеличению времени нахождения рыбами в нижней части танка (Рисунок 66).

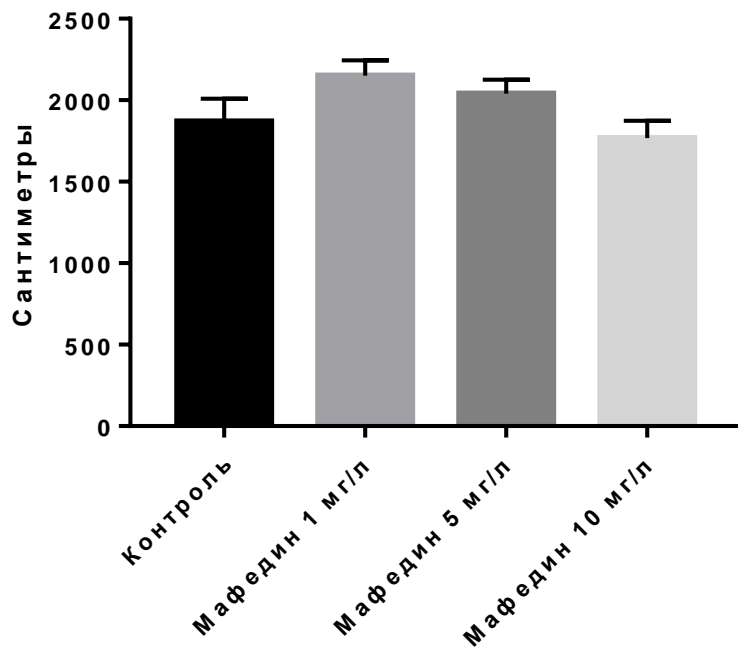


Рисунок 51 – Влияние хронического введения мафедина на проплывную дистанцию зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3).

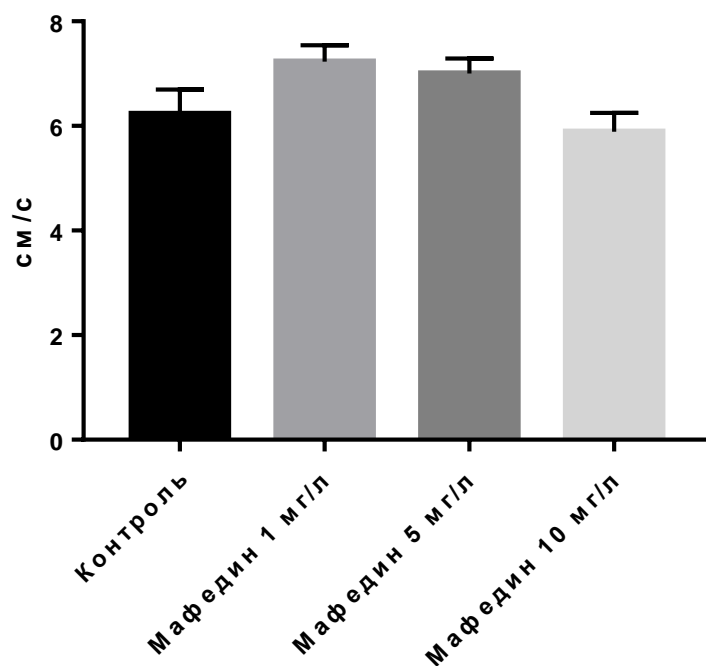


Рисунок 52 – Влияние хронического введения мафедина на среднюю скорость зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3).

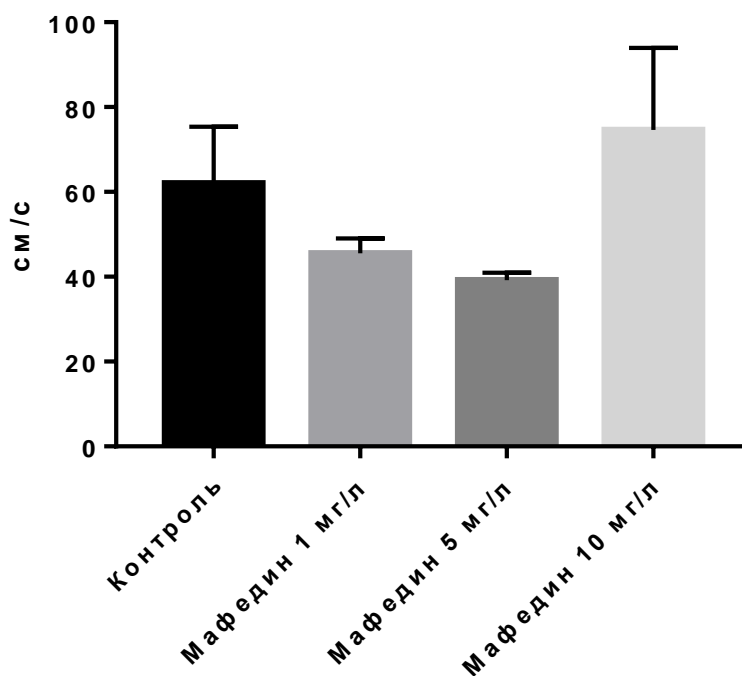


Рисунок 53 – Влияние хронического введения мафедина на максимальную скорость зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3).

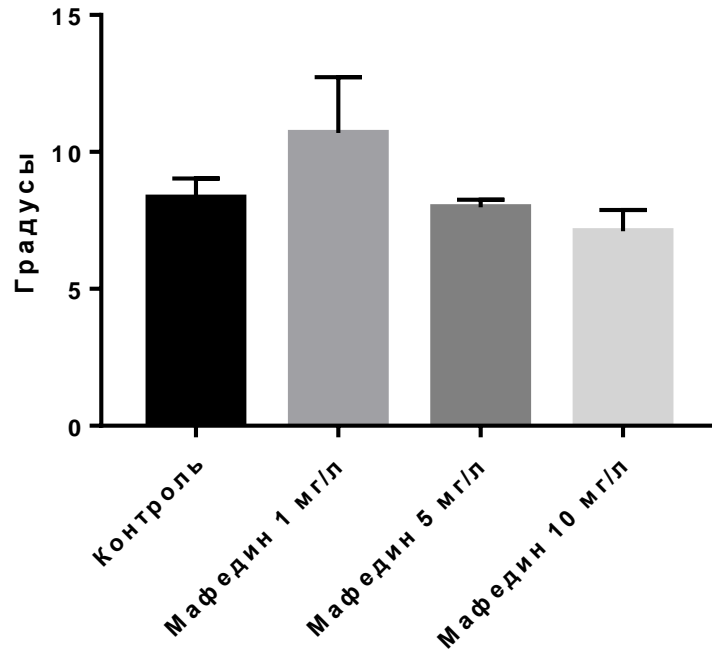


Рисунок 54 – Влияние хронического введения мафедина на угол поворота зебрaдaниo в тесте НА (Эксперимент 3).

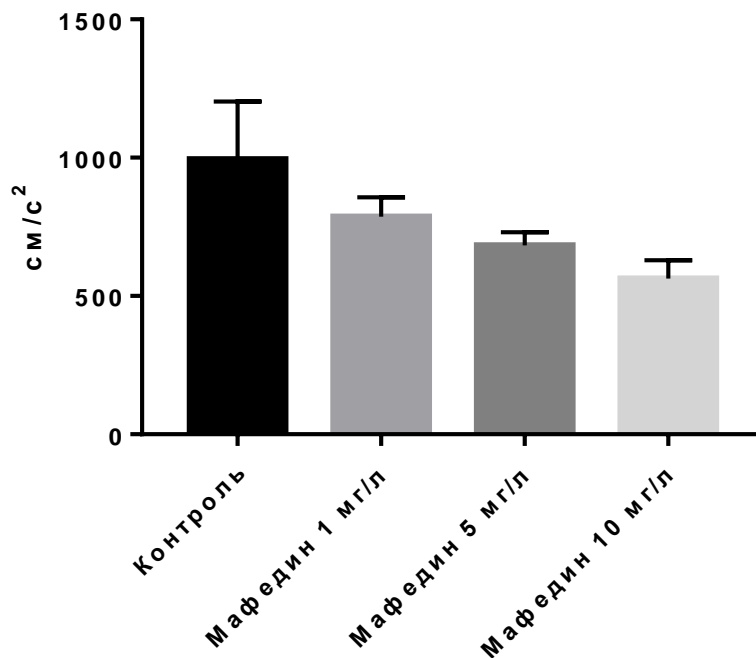


Рисунок 55 – Влияние хронического введения мафедина на максимальное ускорение зебрaдaниo в тесте НА (Эксперимент 3).

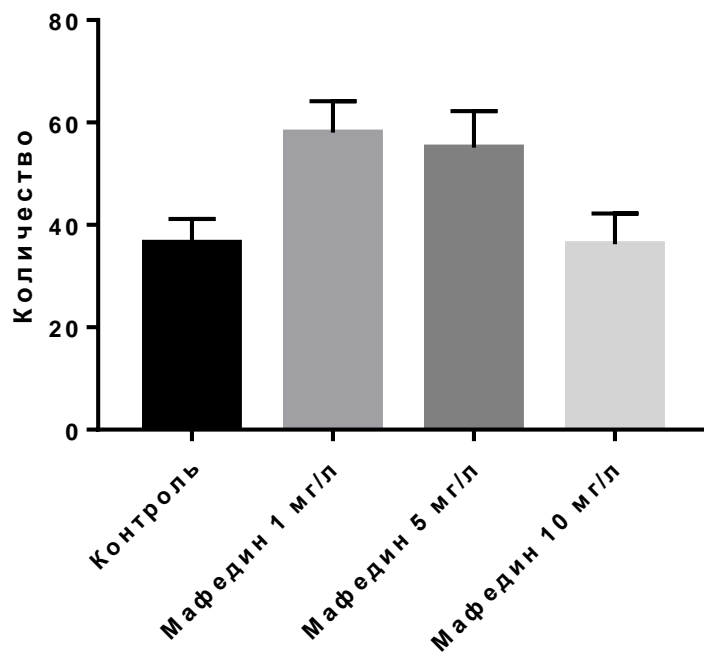


Рисунок 56 – Влияние хронического введения мафедина на количество ускоренный зераданио в тесте НА (Эксперимент 3).

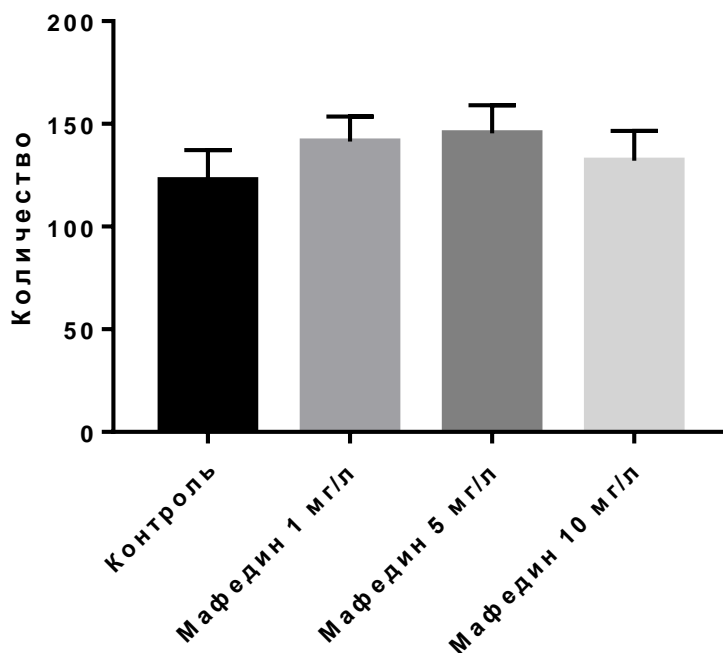


Рисунок 57 – Влияние хронического введения мафедина на количество замираний зераданио в тесте НА (Эксперимент 3).

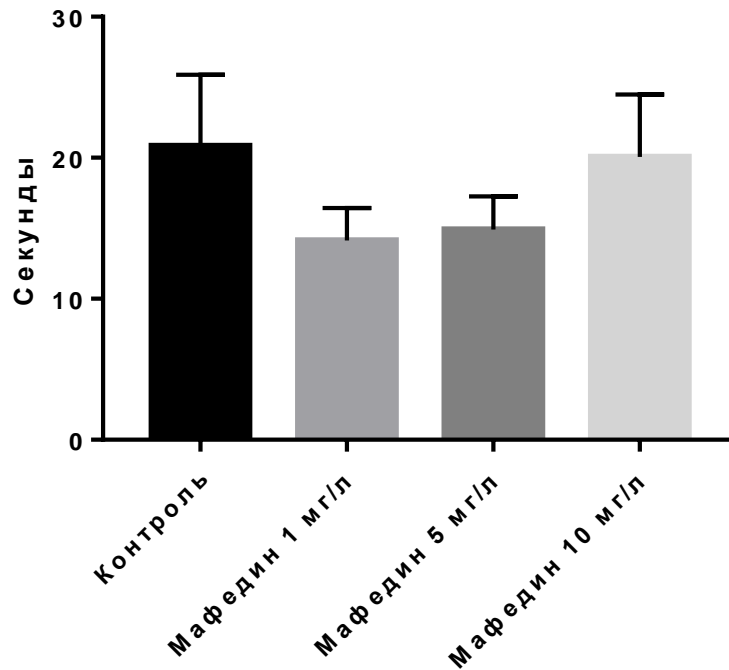


Рисунок 58 – Влияние хронического введения мафедина на общее время замираний зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3).

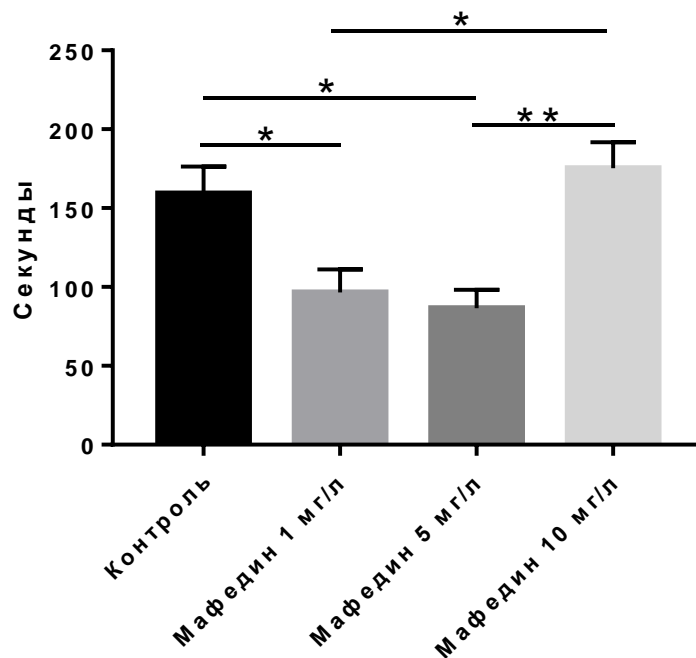


Рисунок 59 – Влияние хронического введения мафедина на длительность состояния низкой мобильности зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  по критерию Крускаля-Уоллиса.

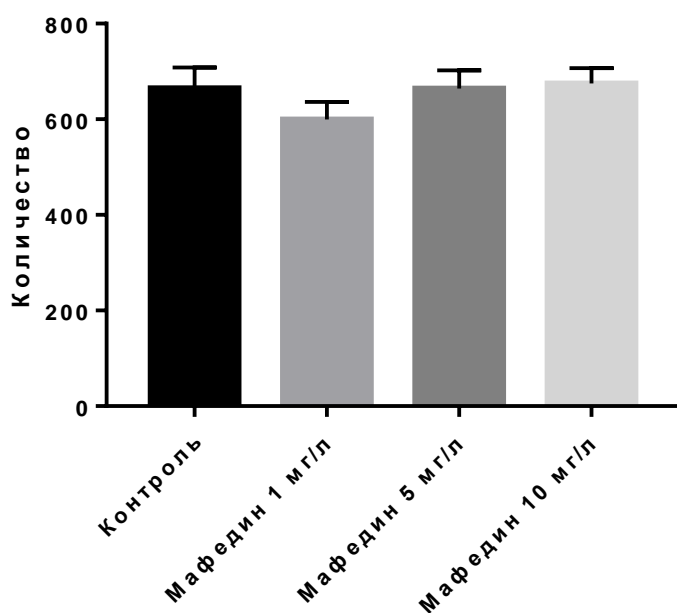


Рисунок 60 – Влияние хронического введения мафедина на частоту состояния низкой мобильности зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3).

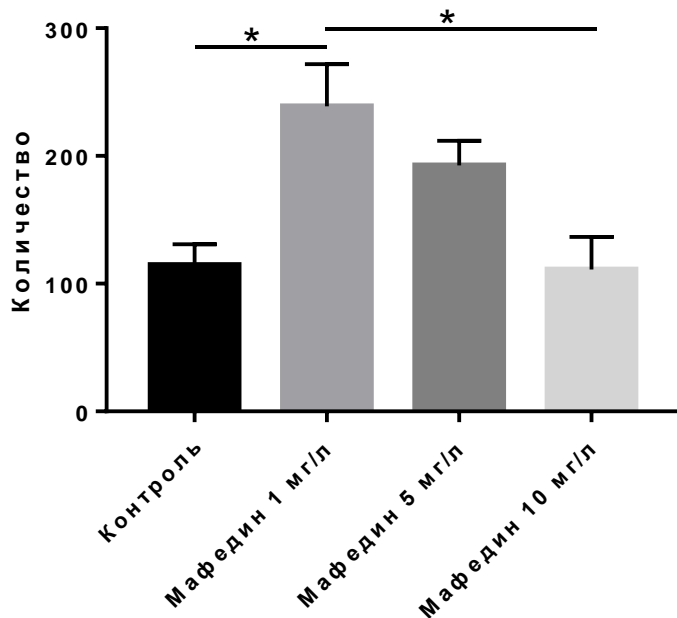


Рисунок 61 – Влияние хронического введения мафедина на частоту состояния высокой мобильности зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3). \*  $p < 0,05$  по критерию Крускаля-Уоллиса.



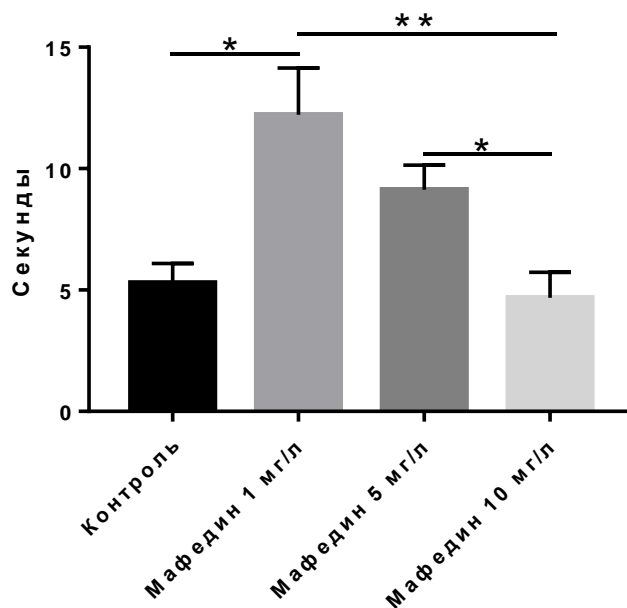


Рисунок 62 – Влияние хронического введения мафедина на длительность состояния высокой мобильности зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  по критерию Крускала-Уоллиса.

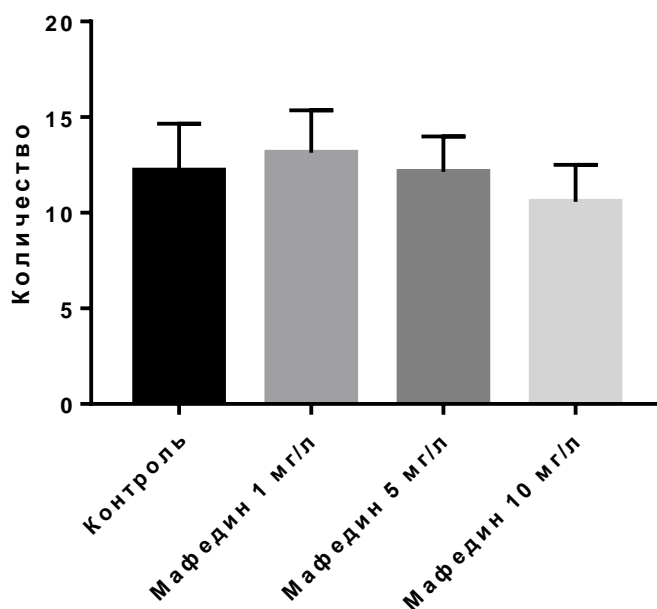


Рисунок 63 – Влияние хронического введения мафедина на количество всплываний из нижней части бассейна в верхнюю зебраданио в тесте НА (Эксперимент 3).

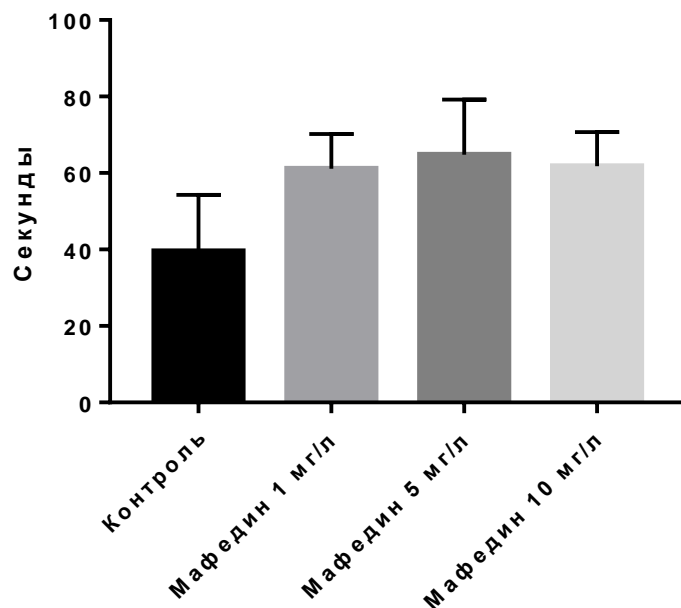


Рисунок 64 – Влияние хронического введения мафедина на время первого всплытия из нижней части бассейна в верхнюю зебраданию в тесте НА (Эксперимент 3).

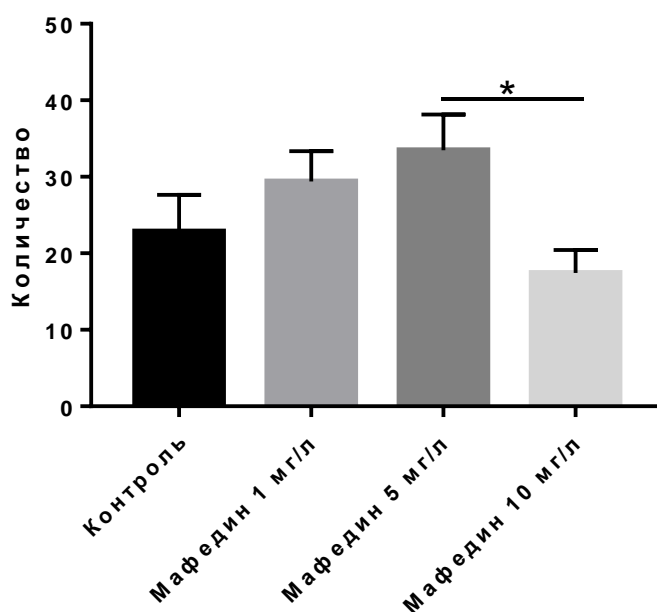


Рисунок 65 – Влияние хронического введения мафедина на частоту нахождения зебраданию в нижней части бассейна в тесте НА (Эксперимент 3). \*  $p < 0,05$  по критерию Крускала-Уоллиса.

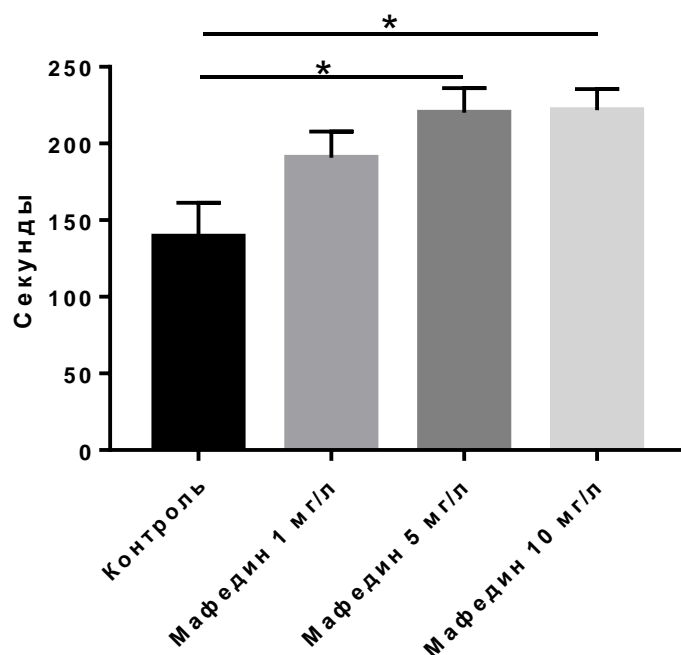


Рисунок 66 – Влияние хронического введения мафедина на общее время нахождения зебраданио в нижней части бассейна в тесте НА (Эксперимент 3). \*  $p < 0,05$  по критерию Крускаля-Уоллиса.

Таким образом, была подобрана доза мафедина для зебраданио, при которой у тестируемых животных наблюдали достоверные поведенческие изменения в тесте «Новый аквариум». Наиболее важными представляются результаты Эксперимента 2, в котором у рыб отменялось действие мафедина при одновременном введении антагониста альфа-2<sub>c</sub> адренорецепторов, что позволяет говорить о том, что мафедин является агонистом данных рецепторов. Кроме того, у зебраданио наблюдались психостимулирующие (увеличение длины проплытой дистанции, уменьшение времени и частоты замираний) и анксиогенные эффекты (увеличение времени нахождения в нижней части аквариума), что необходимо учитывать при изучении мафедина на других животных моделях, поскольку эффекты, наблюдаемые у зебраданио могут быть аналогичными у других видов.

В настоящее время острые эффекты агонистов альфа 2-адренорецепторов на зебраданио еще не изучались. Поскольку НА позволяет

оценивать исследовательское поведение и уровень тревожности, а также локомоторные параметры зебраданио, сравнивать полученные результаты представляется возможным с результатами аналогичных исследований с использованием других животных моделей - например, с традиционно используемыми на грызунах тестами «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) (Stewart, A. M., 2014).

В целом, увеличение проплытой в течение времени тестирования дистанции, а также некоторое повышение средней скорости может говорить об умеренном психостимулирующем действии изучаемого соединения, что является нехарактерным для других агонистов альфа-2 адренорецепторов. Например, введение 50 мкг/кг клонидина мышам достоверно уменьшало их общую двигательную активность в тесте «открытое поле» в условиях острого эксперимента (Wrenn, C. C., 2015). В другом исследовании, с использованием мышей с индуцированным ожирением, спустя 24 ч после введения гуанфафина (2 мг/кг), наблюдалось статистически значимое уменьшение локомоторной активности у животных в клетке по сравнению с контролем (Dudek, M., 2015). Дексмететомидин, высокоселективный агонист альфа-2 адренорецепторов, вводимый экспериментальным мышам в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, аналогично приводил к снижению двигательной активности животных спустя 20 мин после введения (Sallinen, J. 1999).

Поскольку рыбы, получавшие мафедин в дозе 60 мг/л, достоверно дольше находились в нижней части НА по сравнению с контрольными животными, можно говорить об анксиогенном действии изучаемого вещества. Данную точку зрения подтверждает и то, что у этих рыб статистически значимо увеличивалась частота замирания по сравнению с контрольной группой. Также, эти эффекты не могли быть связаны с неспецифической гипоактивностью, так как мафедин оказывал умеренное обратное (психостимулирующее) действие.

В целом, обнаруженные анксиогенные эффекты мафедина согласуются с предположением о его психостимулирующем действии, так как средства,

стимулирующие ЦНС, обычно увеличивают уровень тревожности у экспериментальных животных (Baldwin, H. A., 1989; Bhattacharya, S. K., 1997) и людей (Loke, W. H., 1988; Smith, A., 2002; Vendruscolo, L. F., 2008).

Хотя анксиогенное действие является нехарактерным для агонистов альфа-2 адренорецепторов, ряд исследований с использованием разных моделей стресса у мышей и крыс продемонстрировали дозозависимость анксиогенного или анксиолитического действия у клонидина в различных тестах.

Так, клонидин в конфликт-тесте по Вогелю и в ПКЛ в диапазоне низких доз (6,25-10,0 мкг/кг) оказывал анксиолитическое действие, в то время как высокие дозы (12,5-80,0 мкг/кг) вызывали анксиогенный эффект. Интересно, что в ПКЛ избирательный агонист альфа-2 адренорецепторов идаксозан блокировал анксиолитический эффект клонидина, но не оказывал эффекта на анксиогенный, в то время как при одновременном введении с клонидином празозина (альфа-1 антагониста) блокировался анксиогенный эффект, но не анксиолитический (Söderpalm, B., 1988).

В другом исследовании, с использованием модели 3-дневного лишения сна у мышей были получены аналогичные результаты: в тесте ПКЛ меньшие дозы клонидина (5 и 10 мкг/кг) вызывали у животных анксиолитический эффект, а высокие (50 и 100 мкг/кг) – анксиогенный. Важно, что бифазность действия сохранялась и на контрольных животных (без лишения сна), несмотря на то, что происходил некоторый сдвиг в диапазоне эффективных доз: дозы 5 и 10 мкг/кг не вызывали никакого эффекта, 50 мкг/кг приводила к снижению уровня тревожности, а 100 мкг/кг – к увеличению (Silva, R. H., 2004).

Авторы связывают данную особенность с тем, что в высоких дозах клонидин может действовать не только на альфа-2, но и на альфа-1 рецепторы (Anden, N. E., 1976; Bradshaw, C. M., 1982).

Схожим образом может действовать и мафедин, вовлекая в разной степени альфа-1 адренорецепторы в зависимости от дозы. Поскольку было показано, что анксиогенный эффект клонидина в высоких дозах обусловлен дей-

ствием именно на альфа-1 адренорецепторы (Söderpalm, B., 1988), не исключается, что мафедин в дозе 60 мг/кг вызывает аналогичный эффект, возбуждая те же самые рецепторы. Подтверждением этому предположению может служить то, что меньшие дозы мафедина не оказывали достоверного повышения тревожности у тестируемых рыб.

Однако, несмотря на вышесказанное, роль альфа-1 адренорецепторов не представляется главной причиной дозозависимости эффектов мафедина и других средств, действующих на альфа-2 адренорецепторы. Например, в исследовании на крысах, которым в область скорлупы прилежащих ядер вводили агонист альфа-1 адренорецепторов фенилэфрин, не было обнаружено изменений в поведении животных в тесте ПКЛ (Kochenborger, L., 2012). Кроме того, ранее было показано, что в клинической практике ни агонисты, ни антагонисты альфа-1 адренорецепторов не эффективны в терапии тревожных расстройств (Millan, M., 2003).

Дозозависимость наблюдаемых эффектов может быть обусловлена, в том числе и тем, что у *Danio rerio* обнаружено 5 подтипов альфа-2 адренорецепторов:  $2_A$ ,  $2_B$ ,  $2_C$ ,  $2_{Da}$  и  $2_{Db}$  (Ruuskanen, J. O., 2005), выполняющих совершенно различные функции у других видов (Hunter, J. C., 1997; Kable, J. W., 2000; Sallinen, J., 1999) (Таблица 10).

В Эксперименте 3 мафедин в дозе 60 мг/л увеличивал максимальную скорость и частоту ускорений, тем самым подтверждая свое психостимулирующее действие, наблюдаемое в Эксперименте 2. Более того, поскольку селективный альфа-2<sub>C</sub> антагонист JP 1302 блокировал наблюдаемые эффекты мафедина, можно говорить о том, что мафедин является агонистом альфа-2<sub>C</sub> АР.

Важной особенностью проведенных экспериментов может быть то, что популяция рыб, участвующих в эксперименте не была разделена на низко- и высокотревожных или же на низко- и высокоактивных. В исследовании на крысах, которым вводились альфа-2 адренотропные средства наблюдались

различия эффектов, регистрируемых в ПКЛ, в зависимости от базового уровня активности тестируемых животных (Uzsoki, B., 2011).

В заключение можно сказать, что поскольку у данного фармакологического средства возможно наличие нейропротекторных свойств, о чем было сказано ранее, его умеренное психостимулирующее действие также может быть использовано для коррекции астении, часто возникающей при патологиях ЦНС. Среди заболеваний, сопровождающихся нарушением работоспособности, могут быть черепно-мозговая травма (Lindenfeld, G., 2017) или инсульт (Turrell, P. J., 2005). Следовательно, мафедин может быть интересен как средство, которое можно применять как в острый период травмы или ишемии головного мозга для улучшения исхода патологии, так и в последующие периоды для коррекции возникающей астении.

Таблица 10 – Локализация в ЦНС, физиологические функции и генетическая гомология различных альфа-2 AP у зебр-данио и грызунов (NA – данные не доступны).

Подтипы рецепторов							
2 <sub>A</sub>		2 <sub>B</sub>		2 <sub>C</sub>		2 <sub>Da</sub> /2 <sub>Db</sub>	
Локализация	Функции	Локализация	Функции	Локализация	Функции	Локализация	Функции
<b><i>Зебраданио</i></b>							
Вентральный мозговой пузырь, преоптическая, претектальная и гипоталамическая области, глазодвигательные ядра, голубое пятно, медиальный шов, ретикулярная формация, клетки Пуркинье мозжечка (Ampatzis, K., 2008)	NA	Гипоталамус (Ruuskanen, J. O., 2005)	NA	Диэнцефалон (Ruuskanen, J. O., 2005)	NA	Мозжечок, <i>optic tectum</i> (2 <sub>Da</sub> ) (Ruuskanen, J. O., 2005)	NA
<b>% гомологии с мышами*</b>							
Гены	81%		82%		85%	NA	NA
Белок	59%		52%		66%	NA	NA
<b>% гомологии с человеком*</b>							
Гены	77%		78%		**	NA	NA
Белок	58%		68%		61%	NA	NA
<b><i>Грызуны (мыши, крысы)</i></b>							



Подтипы рецепторов							
2 <sub>A</sub>		2 <sub>B</sub>		2 <sub>C</sub>		2 <sub>Da</sub> /2 <sub>Db</sub>	
Локализация	Функции	Локализация	Функции	Локализация	Функции	Локализация	Функции
Продолговатый мозг (MacMillan, L. B., 1996), голубое пятно (Kable, J. W., 2000), миндалина, гипоталамус, обонятельная система (Wang, R., 1996), рога спинного мозга (Shi, T. J., 1999)	Гипотензия (MacMillan, L. B. и др., 1996), ноцицепция, гипотермия (Hunter, J. C., 1997) и седация (Kable, J. W., 2000)	Таламус, клетки Пуркинье мозжечка (Wang, R., 1996)	Регуляция сосудистого тонуса (Makaritsis, K. P., 1999)	Стриатум, голубое пятно (Wang, R., 1996), вентральные рога спинного мозга (Shi, T. J., 1999)	Стресс-поведение (Sallinen, J., 1997), память и навигация (Björklund, M., 1998)	NA	NA
<b>% гомологии с человеком*</b>							
Гены	83%		84%		87%	NA	NA
Белок	92%		83%		92%	NA	NA

\* - генетическая (нуклеотидная последовательность) и белковая (аминокислотная последовательность) гомология между видами была оценена с помощью базы данных BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> для *Danio rerio*, *Mus musculus* и *Homo sapiens*, 14.03.2018).

\*\* - нет значимой гомологии (% гомологии недоступен в базе BLAST).

### 3.3. Изучение механизма нейропротекторного действия производного этаноламина

Согласно полученным данным, Аб снижал амплитуду нДУВК с 6 у.е. до 3 у.е. (Рисунок 70). Известный из литературных данных активатор нДУВК, гиперфорин – НУР, восстанавливал амплитуду нДУВК в группе нейронов с Абета с 3 у.е. до 8 у.е. (Рисунок 71). ФДЭС восстанавливал амплитуду нДУВК в группе нейронов с Абета с 3 у.е. до уровня контроля в 6 у.е. (Рисунок 72).

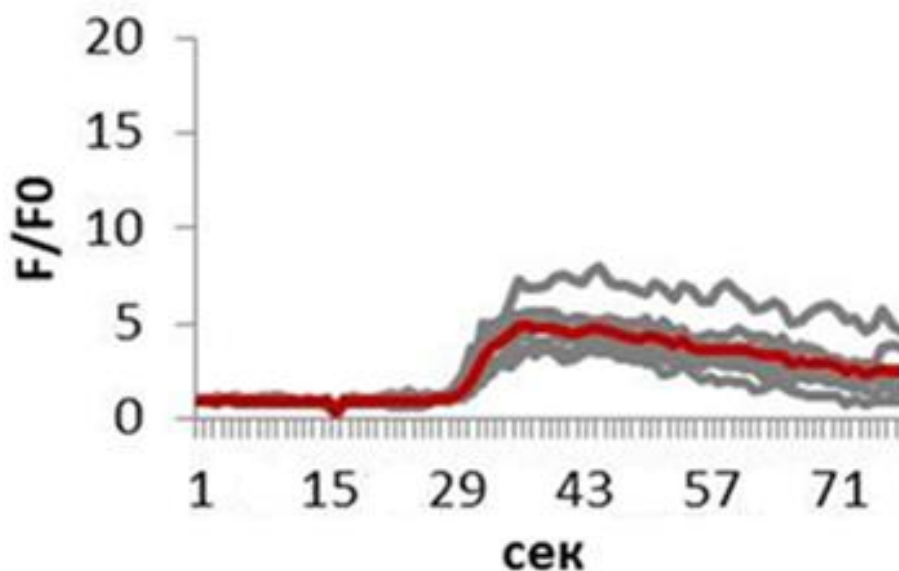


Рисунок 67 – Запись нДУВК в контрольной группе. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В экспериментальной группе было исследовано  $60 \pm 10$  дендритных шипика.

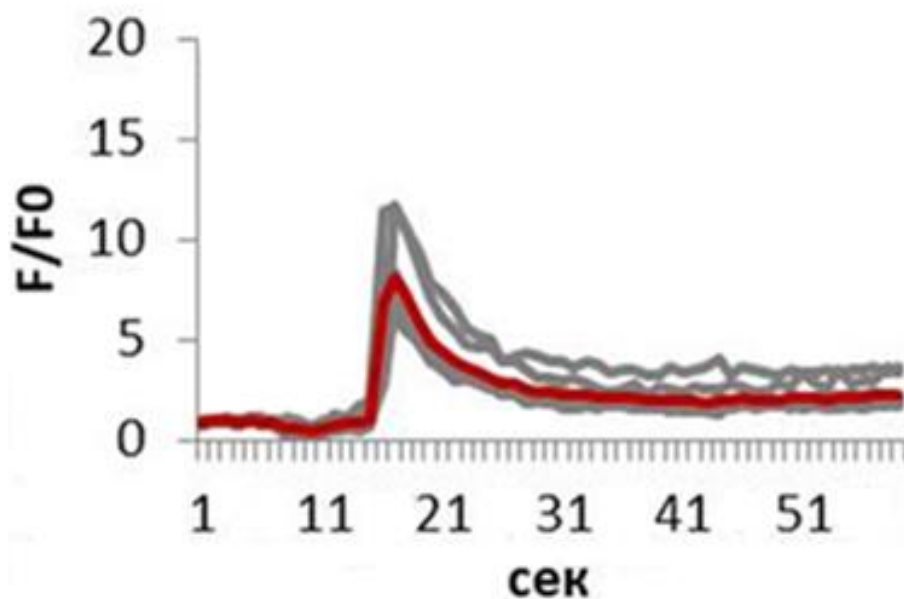


Рисунок 68 – Запись нДУВК в группе контроль+гиперфорин. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В экспериментальной группе было исследовано  $60 \pm 10$  дендритных шипика.

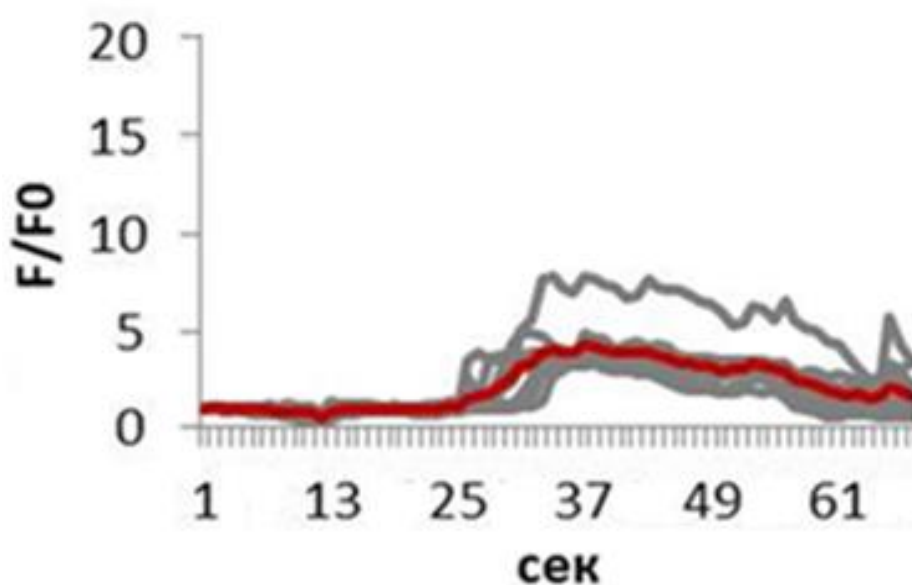


Рисунок 69 – Запись нДУВК в группе контроль+N17 (ФДЭС). На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В экспериментальной группе было исследовано  $60 \pm 10$  дендритных шипика.

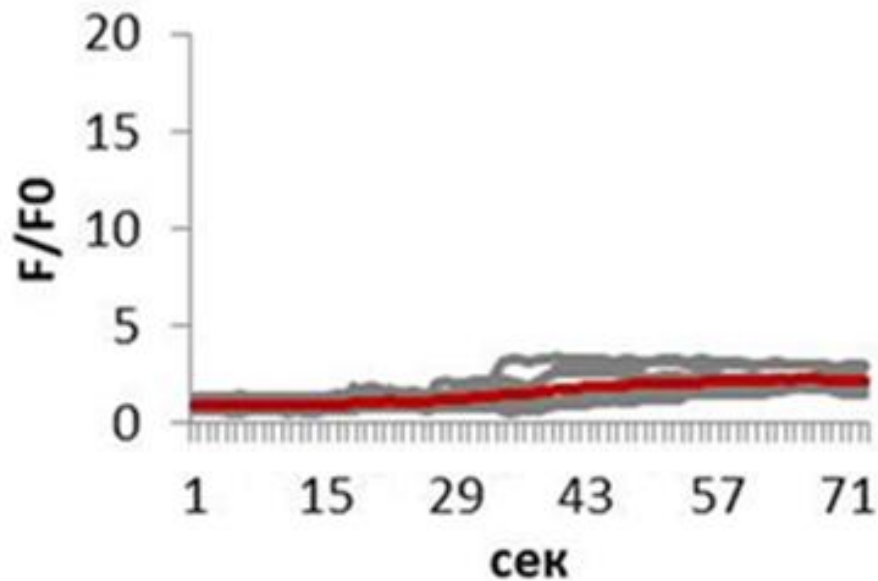


Рисунок 70 – Запись нДУВК в группе бета-амилоида. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В экспериментальной группе было исследовано  $60 \pm 10$  дендритных шипика.

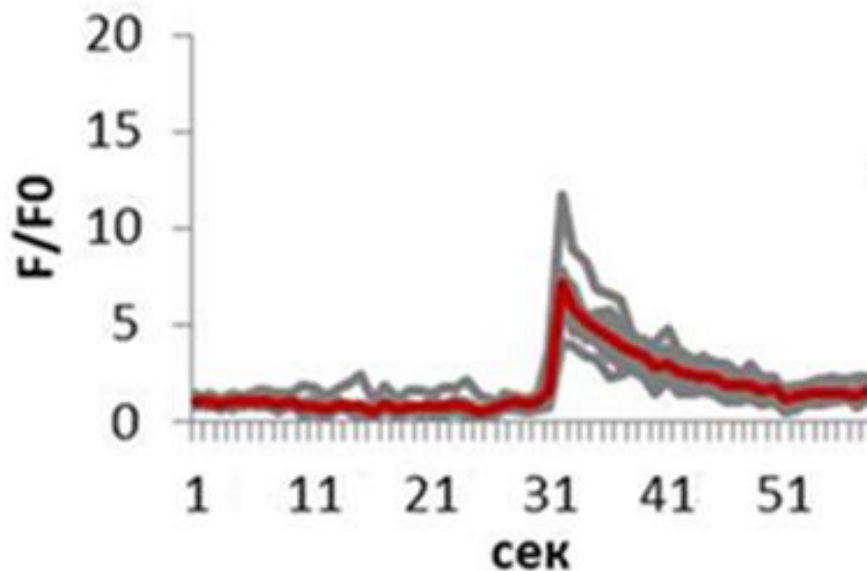


Рисунок 71 – Запись нДУВК в группе бета-амилоид+гиперфорин. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В экспериментальной группе было исследовано  $60 \pm 10$  дендритных шипика.

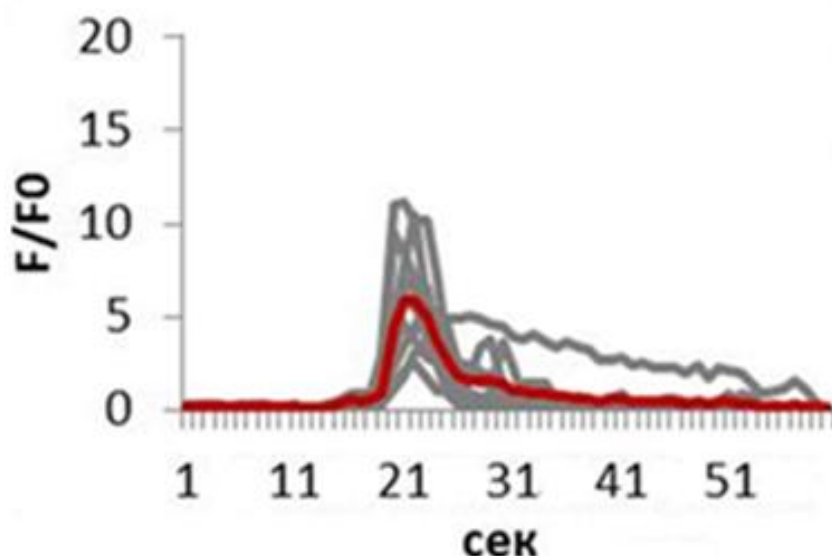


Рисунок 72 – Запись нДУВК в группе бета-амилоид+N17 (ФДЭС). На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В экспериментальной группе было исследовано  $60 \pm 10$  дендритных шипика.

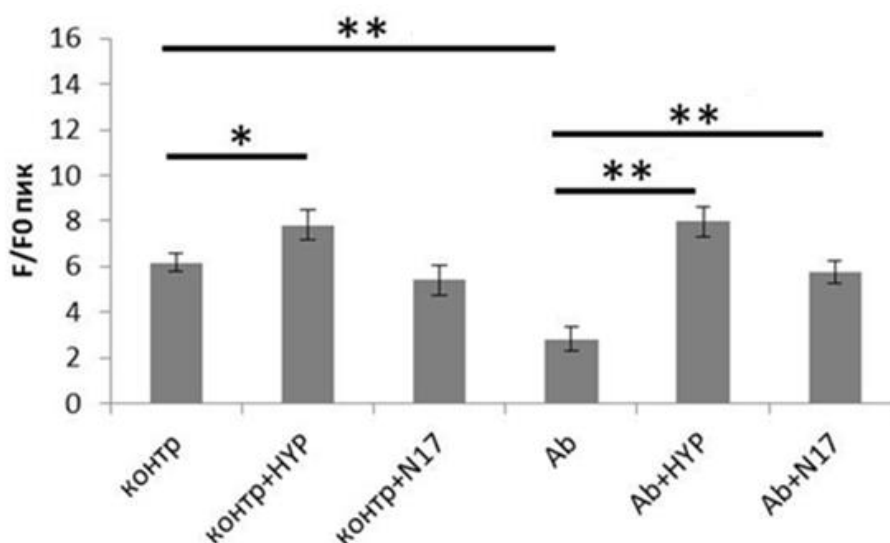


Рисунок 73 – Сравнительный анализ изменения амплитуды нДУВК (F/F0 пик) в исследуемых группах. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено три повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $60 \pm 10$  дендритных шипика. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Сокращения: Контр- контрольная группа, Аб – бета-амилоид, НУР - гиперфорин, N17 – ФДЭС; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  по критерию Крускаля-Уоллиса.

Исследования показали, что выключение экспрессии гена TRPC6 приводила к значительному снижению амплитуды нДУВК с 6 у.е. для контрольной группы (Рисунок 74, 80) до 3 у.е. для группы нейронов с выключенным геном TRPC6 (Рисунки 77, 80). 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. (Рисунки 77, 78, 80). 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 (Рисунки 74, 76, 79, 80). Таким образом, в настоящей работе получено экспериментальное подтверждение, что ФДЭС является специфичным активатором TRPC6-зависимого нДУВК.

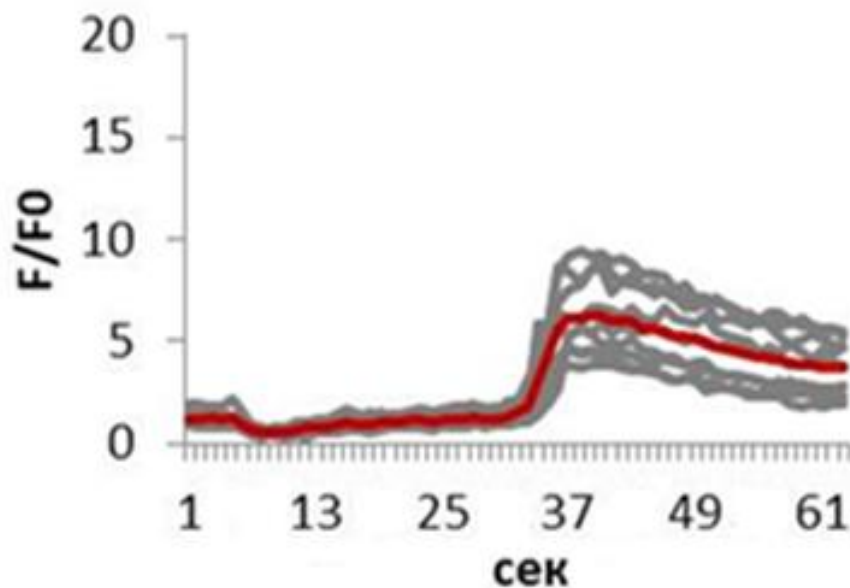


Рисунок 74 – Запись нДУВК в контрольной группе нейронов, которая была трансфицирована siРНК некомплементарной ни к одной клеточной РНК. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено два повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $40 \pm 10$  дендритных шипика.

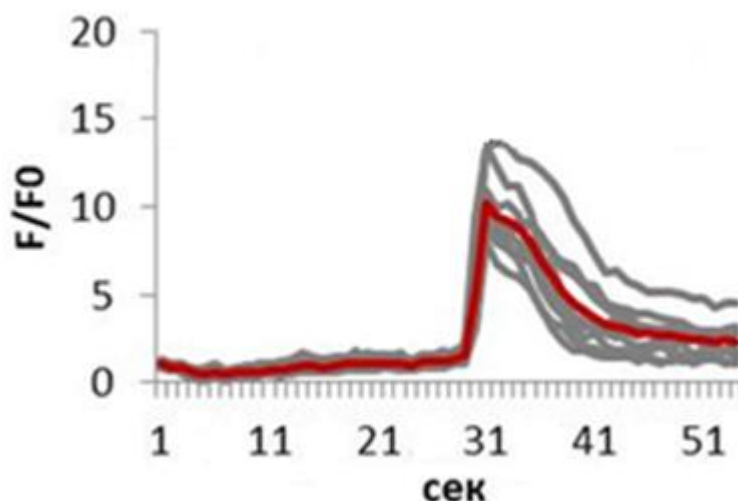


Рисунок 75 - Запись нДУВК в контрольной группе нейронов, которая была трансфицирована siРНК некомплементарной ни к одной клеточной РНК, плюс гиперфорин. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено два повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $40 \pm 10$  дендритных шипика.

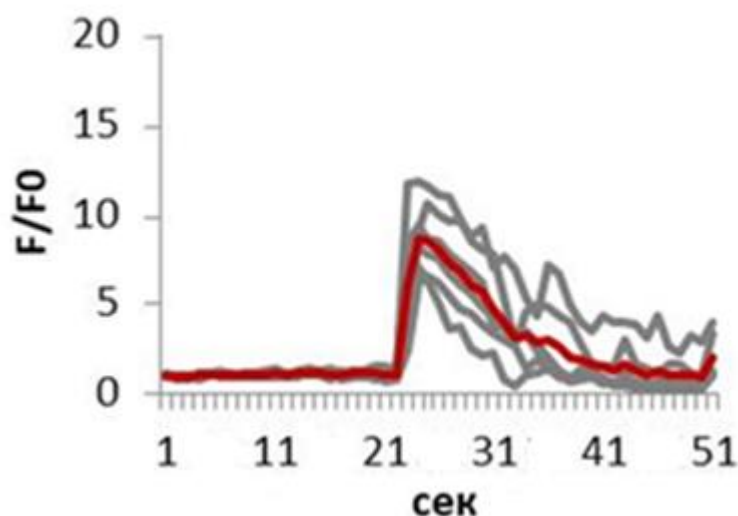


Рисунок 76 – Запись нДУВК в контрольной группе нейронов, которая была трансфицирована siРНК некомплементарной ни к одной клеточной РНК, плюс N17 (ФДЭС). На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено два повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $40 \pm 10$  дендритных шипика.

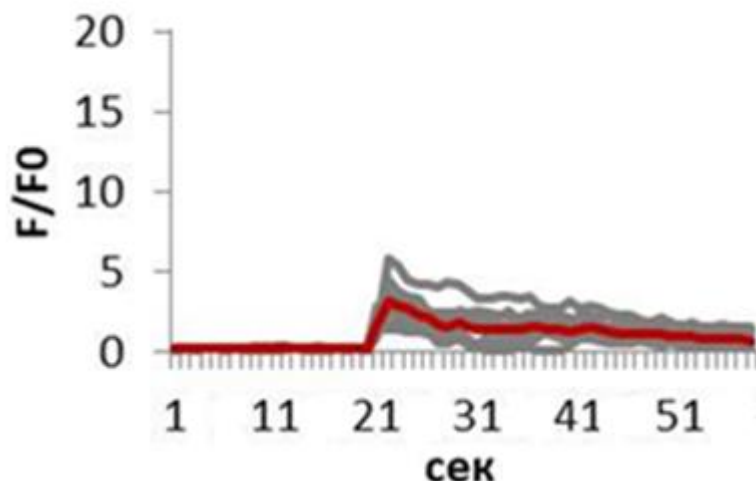


Рисунок 77 – Запись нДУВК в группе нейронов, трансфицированная siРНК которой была комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено два повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $40 \pm 10$  дендритных шипика.

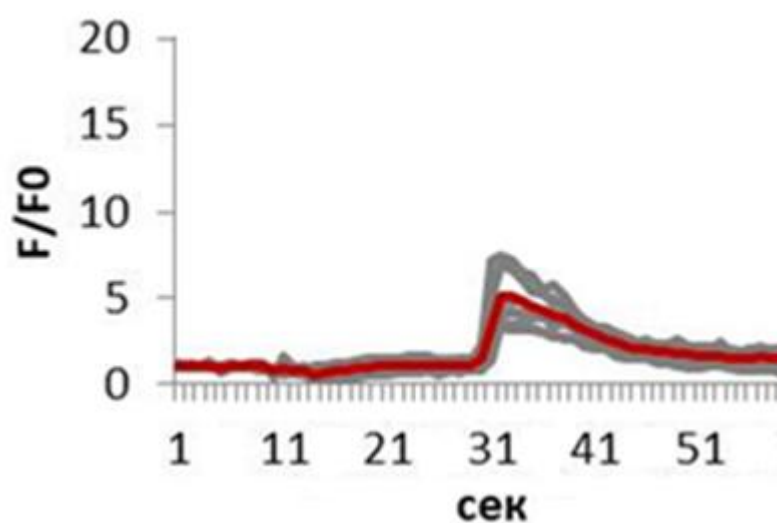


Рисунок 78 – Запись нДУВК в группе нейронов, трансфицированная siРНК которой была комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6, плюс гиперфорин. На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено два повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $40 \pm 10$  дендритных шипика.



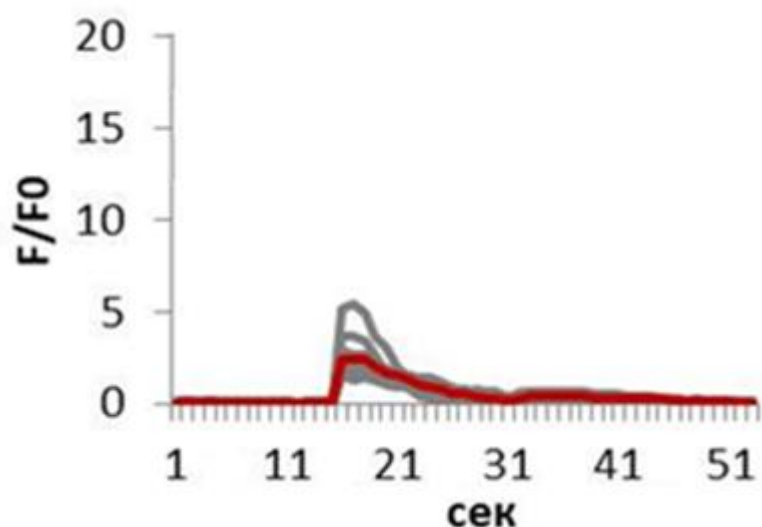


Рисунок 79 – Запись нДУВК в группе нейронов, трансфицированная siРНК которой была комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6, плюс N17 (ФДЭС). На рисунке представлены результаты одного эксперимента. Всего было выполнено два повтора эксперимента. В каждой экспериментальной группе было исследовано  $40 \pm 10$  дендритных шипика.

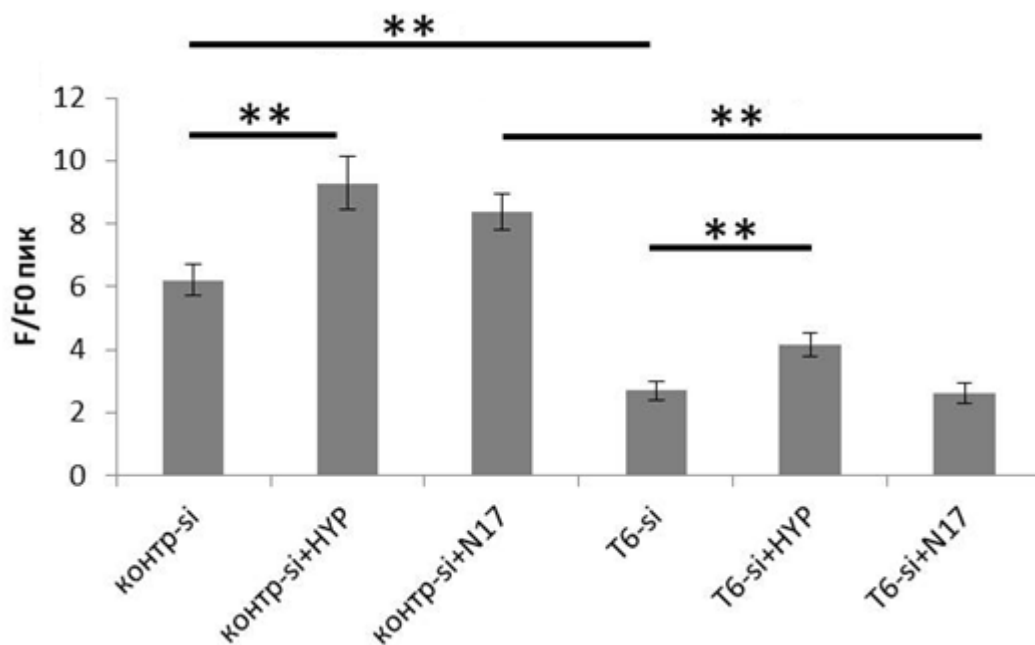


Рисунок 80 – В отсутствие каналов TRPC6 соединение бис{2-((2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси)-N, N-диэтилэтанаминия} бутандиоата не способно активировать нДУВК. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Сокращения: Контр-si контрольная группа

нейронов, которая была трансфицирована siРНК некомплементарной ни к одной клеточной РНК, TRPC6-si - группа нейронов, трансфицированная siРНК комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6, НУР - гиперфорин, N17 – ФДЭС; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  по критерию Крускала-Уоллиса.

Таким образом, 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. Нарушение данного внутриклеточного сигнального пути было недавно описано в литературе (Zhang, H., 2016). Снижение активности нДУВК может приводить к нарушению синаптической пластичности, тем самым разрушая связь между нейронами. Вещества способные восстановить активность нДУВК в нейронах гиппокампа являются перспективными лекарственными средствами для лечения БА и БА ассоциированных деменций. Схожим механизмом действия обладает соединение NSN21778 (N-{4-(2-(6-амино-квиназолин-4-иламино)-этил)-фенил}-ацетамид) Однако, было замечено, что NSN21778 обладает плохой фармакокинетикой и требует оптимизации химической структуры с целью улучшения его фармакокинетических свойств (Zhang, H., 2016).

Это позволяет рассматривать ФДЭС в качестве перспективного соединения для изучения в качестве нейропротекторного средства, в том числе при травмах головного и спинного мозга.

#### 3.4. Исследование эффективности изучаемых соединений для восстановления двигательных функций после ЧМТ

В ходе эксперимента установлено, что травматическое повреждение зоны сенсомоторной коры у крыс вызывает стойкие нарушения двигательных и поведенческих функций, наиболее выраженные в первые сутки после травмы с их постепенным восстановлением в течение последующих дней.

В тесте «Стимулирование конечностей» показатели контрольной группы на 1, 3 и 7 сутки были достоверно ниже показателей здоровых животных в 12,7, 2,7 и 1,8 раза, соответственно. На 3-й день в тесте «Открытое поле» у крыс контрольной группы были снижены общая двигательная и поисково-исследовательская активность по сравнению с группой интактных животных. В тесте ПКЛ на 7-е сутки после травмы время нахождения в закрытых рукавах в контрольной и интактной группах достоверно не различалось. Однако у травмированных крыс наблюдалось некоторое уменьшение времени нахождения в открытых рукавах. Общая двигательная активность в тесте ПКЛ, также, не имела достоверных различий между здоровыми животными и животными с травмой. В тесте «Цилиндр» на 7-е сутки у травмированных животных можно было наблюдать статистически значимое снижение частоты использования передней лапы, расположенной контрлатерально к месту повреждения. Черепно-мозговая травма также вызывала у крыс развитие выраженного сенсомоторного дефицита передней и задней контралатеральных конечностей, фиксируемого в тесте «Сужающаяся дорожка».

#### 3.4.1 Исследование эффективности мафедина

В Эксперименте 1 было установлено, что все испытуемые фармакологические агенты на 7-е сутки давали достоверное улучшение функции передних и задних лап в тесте «Стимулирование конечностей». В то же время достоверных различий между активностью испытуемых лекарственных средств получено не было (Таблица 7).

Таблица 7 – 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)##

Группа	1-й день	3-й день	7-й день
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: ## -  $p < 0,01$  - достоверные отличия от интактных животных по критерию Крускалля-Уоллиса; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  достоверные отличия от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускалля-Уоллиса.

В тесте ОП мафедин, вводимый в дозе 2,5 мг/кг статистически значимо увеличивал показатель 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 ПИА в данном тесте (Таблица 8).

Таблица 8 – ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы (Эксперимент 1)

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

Примечание: ## -  $p < 0,01$  - достоверные отличия от интактных животных по критерию Крускалля-Уоллиса; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  достоверные отличия от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускалля-Уоллиса.

Ни клонидин, ни мафедин в обеих дозах не приводили к изменению времени нахождения крыс в открытых и закрытых рукавах в тесте ПКЛ. ОДА

и время нахождения в центре лабиринта у животных данных групп также не отличались от контроля.

Ни одно из испытываемых лекарственных средств не увеличивало частоту использования контралатеральной лапы в тесте «Цилиндр».

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 9).

Таблица 9 – Степень выраженности сенсомоторного дефицита передней (СД-П) и задней (СД-З) контралатеральных 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*

Примечание: ## -  $p<0,01$  - достоверные отличия от интактных животных по критерию Крускалля-Уоллиса; \* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,01$  достоверные отличия от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускалля-Уоллиса.

Введение мафедина или клонидина травмированным животным несколько улучшало функцию передних конечностей в «Staircase» тесте. Однако, из-за большого разброса результатов внутри группы, данные улучшения не были статистически достоверными.

В Эксперименте 2 в тесте «Стимулирование конечностей» мафедин в дозе 2,5 мг/кг на 3-е сутки достоверно улучшал функцию передних и задних

конечностей травмированных животных в данном тесте по сравнению с контролем ( $p=0,0484$ ). Йохимбин отменял положительный эффект мафедина в данном тесте на 3-е сутки после травмы ( $p=0,0071$ ) (Рисунок 81).

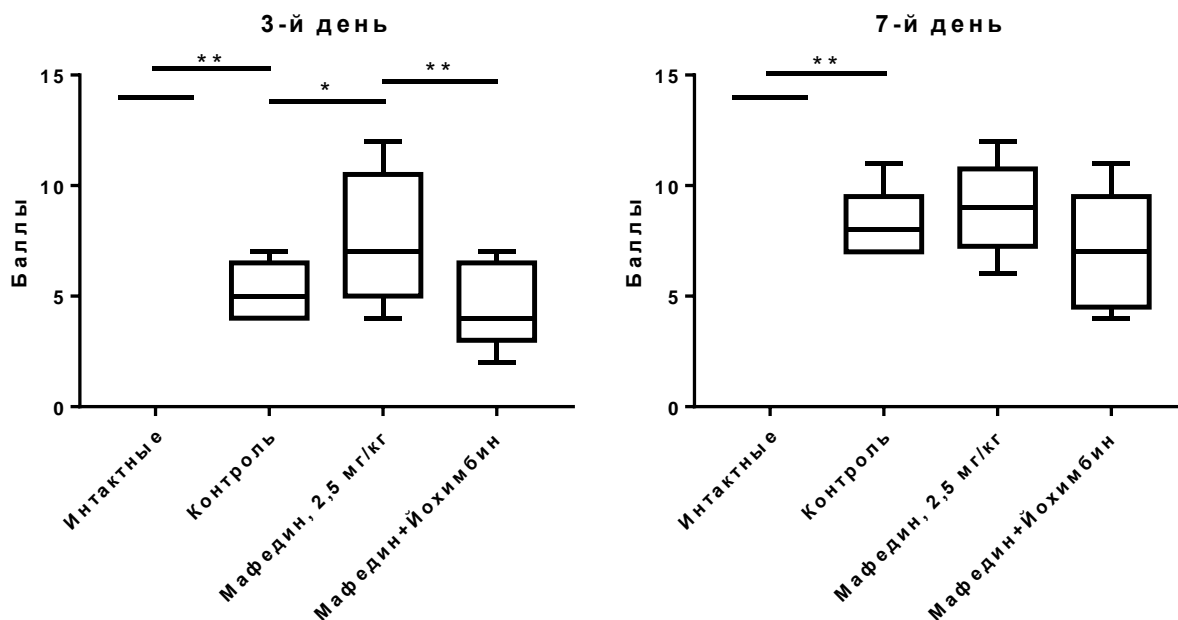


Рисунок 81 – Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей» (Эксперимент 2).

\*- достоверное отличие ( $p < 0,05$ ), \*\*- достоверное отличие ( $p < 0,01$ ) по критерию Крускала-Уоллиса.

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 эквимоллярных 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 82).

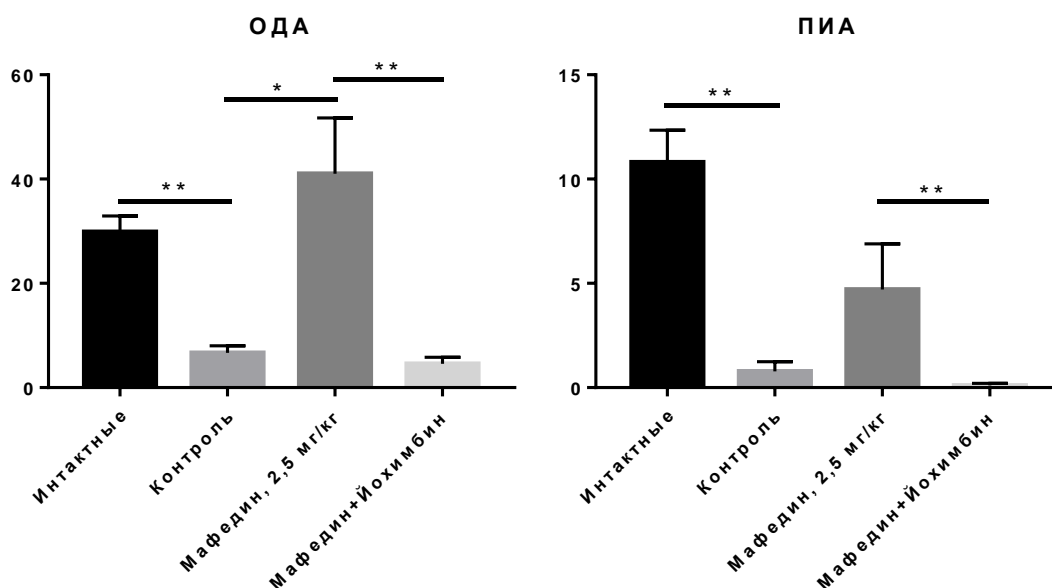


Рисунок 82 – ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы (Эксперимент 2). \*- достоверное отличие ( $p < 0,05$ ), \*\* - достоверное отличие ( $p < 0,01$ ) от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускаля-Уоллиса.

Мафедин в дозе 2,5 мг/кг не оказывал влияния на поведение травмированных животных в тесте ПКЛ в Эксперименте 2. Однако одновременное введение йохимбина с мафедином приводило к достоверному снижению времени нахождения в открытых рукавах ( $p=0,0196$ ) и общей двигательной активности у травмированных животных ( $p=0,0030$ ) по сравнению с группой мафедина.

В Эксперименте 2 мафедин в дозе 2,5 мг/кг увеличивал частоту использования контрлатеральной конечности травмированными животными в тесте «Цилиндр» ( $p=0,0361$ ), при этом, йохимбин не отменял его положительного эффекта). В тесте «Сужающаяся дорожка» в Эксперименте 2 мафедин в дозе 2,5 мг/кг, как и в Эксперименте 1, улучшал функцию передней и задней конечностей у травмированных животных. Введение йохимбина не отменяло положительного эффекта мафедина.

В Эксперименте 2, также, как и в Эксперименте 1, мафедин в дозе 2,5 мг/кг не оказывал статистически значимого положительного эффекта на функцию передней контрлатеральной конечности в тесте «Staircase».

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 эффекты изучаемого соединения, что позволяет говорить о том, что в положительном эффекте последнего принимают участие альфа-2 адренорецепторы.

#### 3.4.2 Исследование эффективности производного этаноламина

В Эксперименте 1 в тесте «Стимулирование конечностей» достоверное улучшение функции передней и задней контрлатеральной конечностей были обнаружены на 7-й день после травмы у животных всех экспериментальных групп, получавших лечение. 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. Важно заметить, что ФДЭС в дозе 75 мг/кг демонстрировал достоверный эффект только на 3-й день после травмы ( $p=0,0129$ ) (Таблица 10).

Таблица 10 – 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	0 (0; 1.5) ##	5 (4; 7) ##	8 (6; 8) ##



Группа	1-й день	3-й день	7-й день
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)**

Примечание: ## -  $p < 0,01$  - достоверные отличия от интактных животных по критерию Крускалля-Уоллиса; \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  достоверные отличия от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускалля-Уоллиса.

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 11).

Таблица 11 – ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы (Эксперимент 1)

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 Крускалля-Уоллиса; \*\* -  $p < 0,01$  достоверные отличия от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускалля-Уоллиса.

В тесте ПКЛ в Эксперименте 1 холина альфосцерат и цитиколин достоверно снижали ОДА по сравнению с контролем ( $p = 0,0014$  и  $p = 0,0056$ , соот-

ветственно). ФДЭС в дозах 10 мг/кг и 75 мг/кг в отличие от вышеуказанных средств не изменял поведение животных в данном тесте (Таблица 12).

Таблица 12 – Время в открытых и закрытых рукавах и ОДА животных в тесте ПКЛ на 7-й день после травмы (Эксперимент 1)

Группа	Время в ОР, сек	Время в ЗР, сек	ОДА
Интактные	22,0±7,5	151,9±9,9	12,1±2,1
Контроль	6,0±4,2	171,9±4,8	14,1±3,1
Х. альфосцерат	4,0±4,0	171,6±4,5	2,5±0,8**
Цитиколин	3,1±3,1	172,1±5,1	3,4±0,7**
ФДЭС, 75 мг/кг	12,2±6,9	164,3±8,9	5,7±1,4
ФДЭС, 10 мг/кг	19,8±12,9	153,0±17,3	7,1±2,4

Примечание: \*\* -  $p < 0,01$  достоверные отличия от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускала-Уоллиса.

В тесте «Цилиндр» в Эксперименте 1 и 2 ни одно из испытуемых средств не увеличивало частоту использования контралатеральной передней лапы по сравнению с контролем.

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 13).

Таблица 13 – 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

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

В Эксперименте 2 в тесте «Стимулирование конечностей» скополамин блокировал эффекты ФДЭС на 7-е сутки после травмы ( $p = 0,0120$ ) (Рисунок 83).

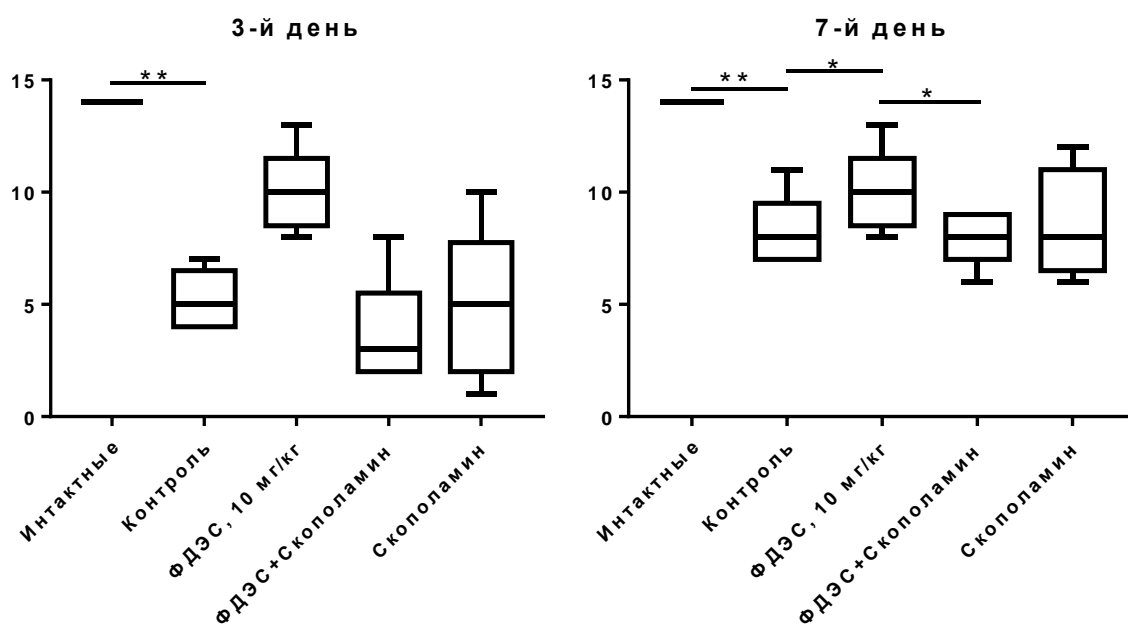


Рисунок 83 – Влияние исследуемых препаратов на функции конечностей животных после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей» (Эксперимент 2).

\* - достоверное отличие ( $p < 0,05$ ), \*\* - достоверное отличие ( $p < 0,01$ ) по критерию Крускала-Уоллиса.

В эксперименте 2 в тесте «Открытое поле» у животных, которым вводили скополамин наблюдалось достоверное увеличение ОДА по сравнению с контролем ( $p=0,0007$ ). Одновременное введение ФДЭС и скополамина ликвидировало данный эффект ( $p=0,0010$ ) (Рисунок 84).

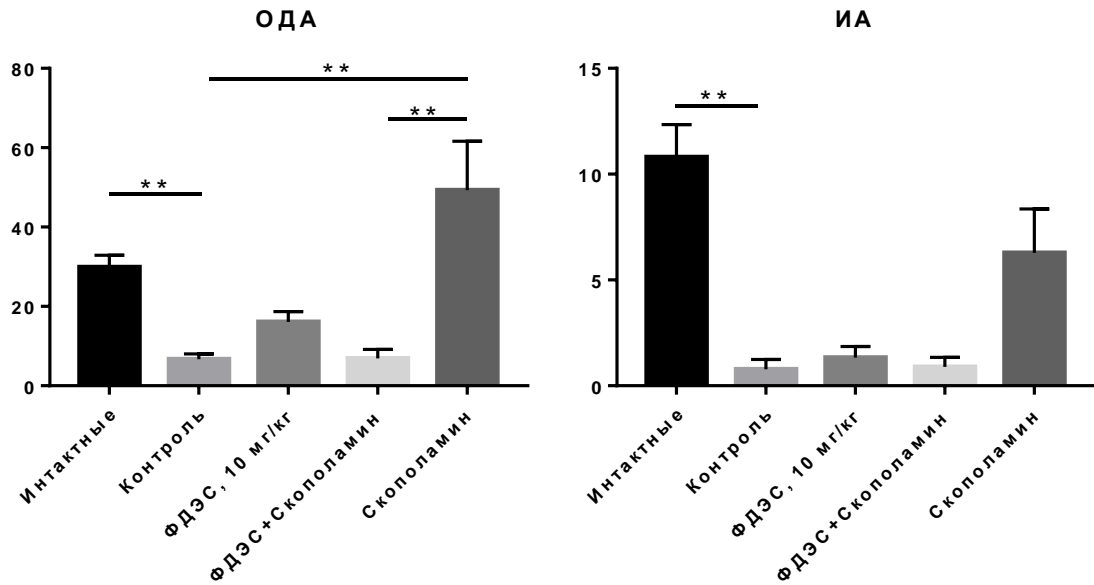


Рисунок 84 – ОДА и ПИА животных в тесте ОП на 3-и сутки после травмы (Эксперимент 2). \*- достоверное отличие ( $p<0,05$ ), \*\* - достоверное отличие ( $p<0,01$ ) по критерию Крускаля-Уоллиса.

В Эксперименте 2 у животных, которым одновременно вводили и ФДЭС, и скополамин наблюдалось уменьшение ОДА в ПКЛ, по сравнению с интактными ( $p=0,0205$ ) и контрольными ( $p=0,0384$ ) животными (Рисунок 85).

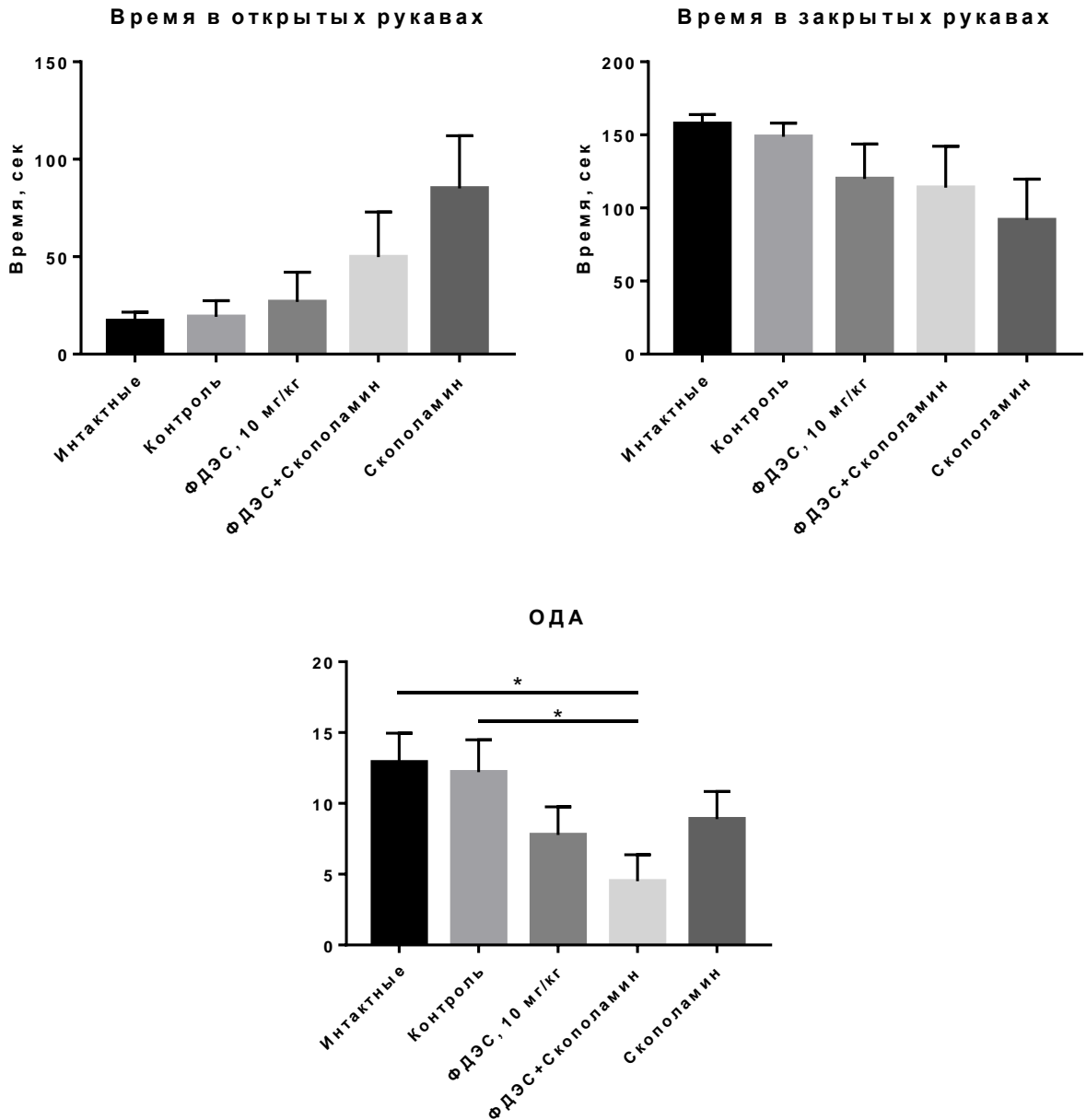


Рисунок 85 – Время в открытых и закрытых рукавах и ОДА животных в тесте ПКЛ на 7-й день после травмы (Эксперимент 2). \*- достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) по критерию Крускала-Уоллиса.

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 86).

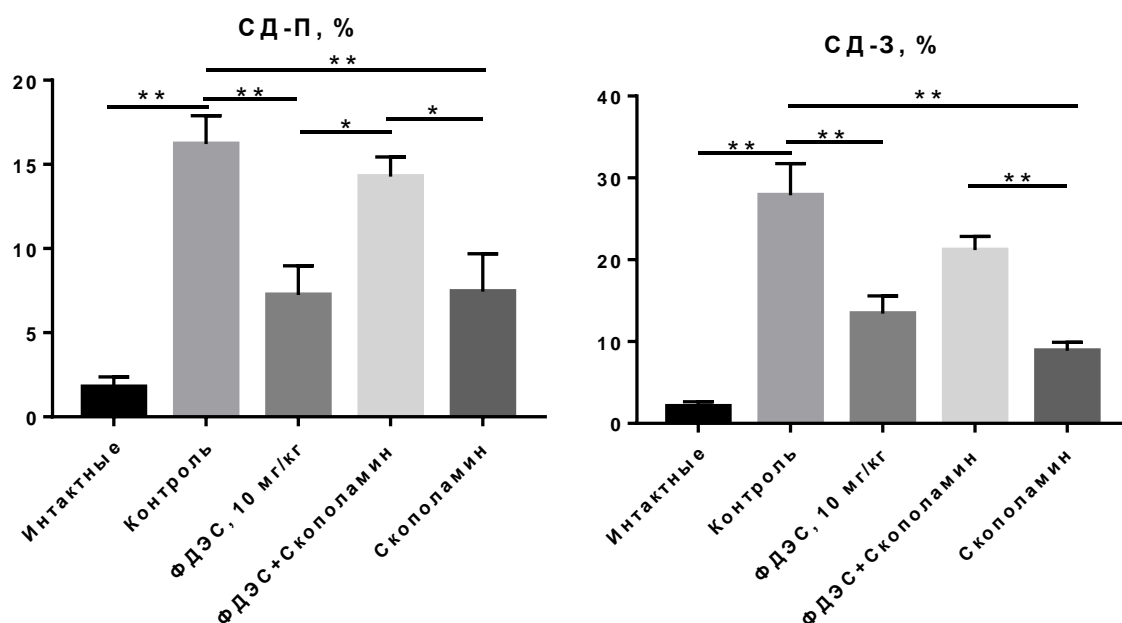


Рисунок 86 – Степень выраженности сенсомоторного дефицита передней (СД-П) и задней (СД-З) контрлатеральных конечностей животных в тесте «Сужающаяся дорожка» на 7 сутки после травмы (Эксперимент 2). \*- достоверное отличие ( $p < 0,05$ ), \*\* - достоверное отличие ( $p < 0,01$ ) по критерию Крускала-Уоллиса.

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.

### 3.4.3 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 14).

Таблица 14 – Объем повреждения головного мозга крыс на 7-й день после травмы

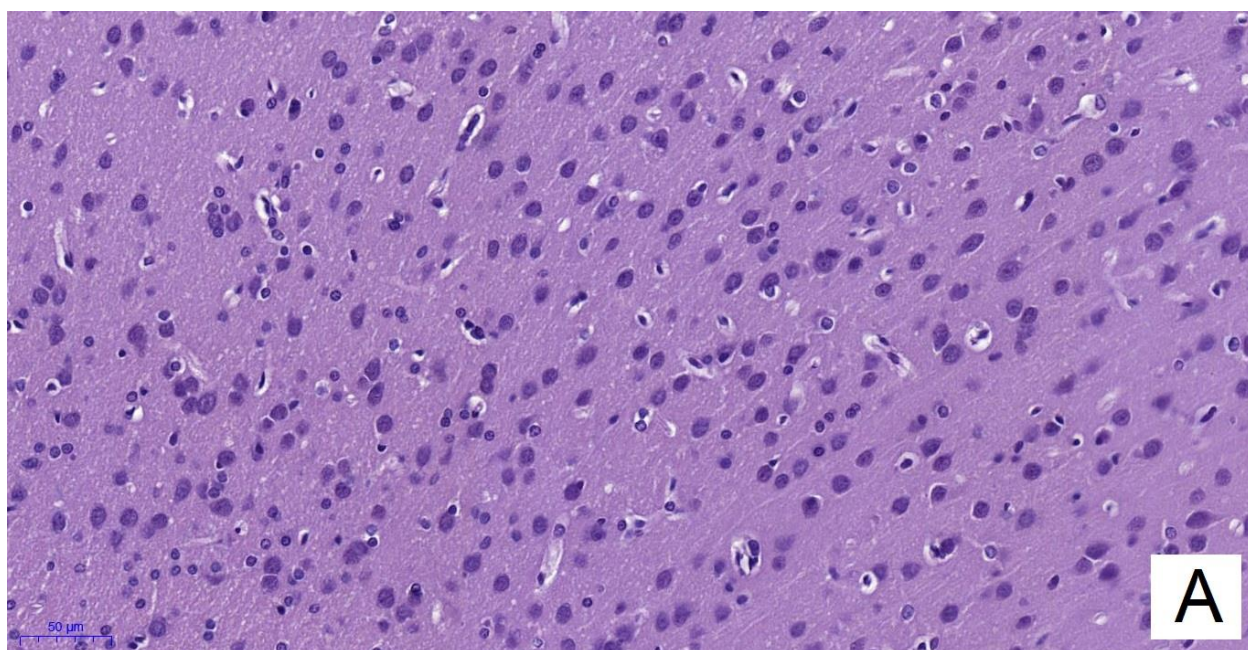
Группа	Объем повреждения, мм <sup>3</sup>
Контроль	51,9±5,8
Цитиколин	41,4±7,6
ФДЭС 10 мг/кг	43,5±5,4
Клонидин	48,0±10,8
Мафедин 2,5 мг/кг	33,2±5,4*

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

При гистологическом исследовании в ткани мозга крыс после травмы в не травмированном полушарии наблюдались реактивные изменения, проявлявшиеся в основном в значительном расширении периваскулярных пространств, цитоархитектоника коры не была нарушена (Рисунок 87А). В противоположном полушарии 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 (Рисунок 87Б). У животных, с такой же травмой, но получавших в качестве лечения мафедин в дозе 2,5 мг/кг очаг

некроза так же определяется, видны небольшие полости, мелкие кровоизлияния и небольшие участки ткани, лишенные клеток, но в отличие от животных контрольной группы, в этом случае зернистые шары практически отсутствуют, а количество глиальных клеток и тканевых макрофагов в некоторых участках не увеличено, в других даже уменьшено (Рисунок 87В).

Проведенные эксперименты показали, что мафедин, вводимый крысам в течение 7 дней после ЧМТ уменьшает у экспериментальных животных объем повреждения головного мозга, а также интенсивность воспалительных процессов в очаге травмы. Введение производного этаноламина не способствовало уменьшению объема повреждения травмированных животных по сравнению с контрольной группой.





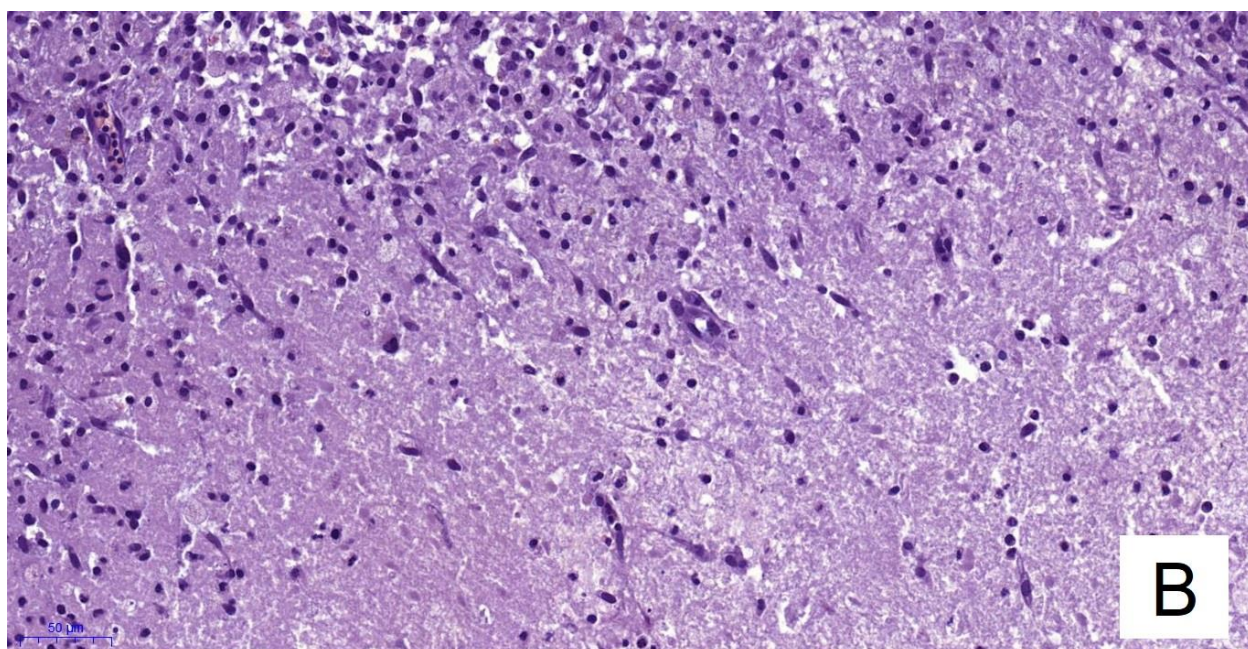
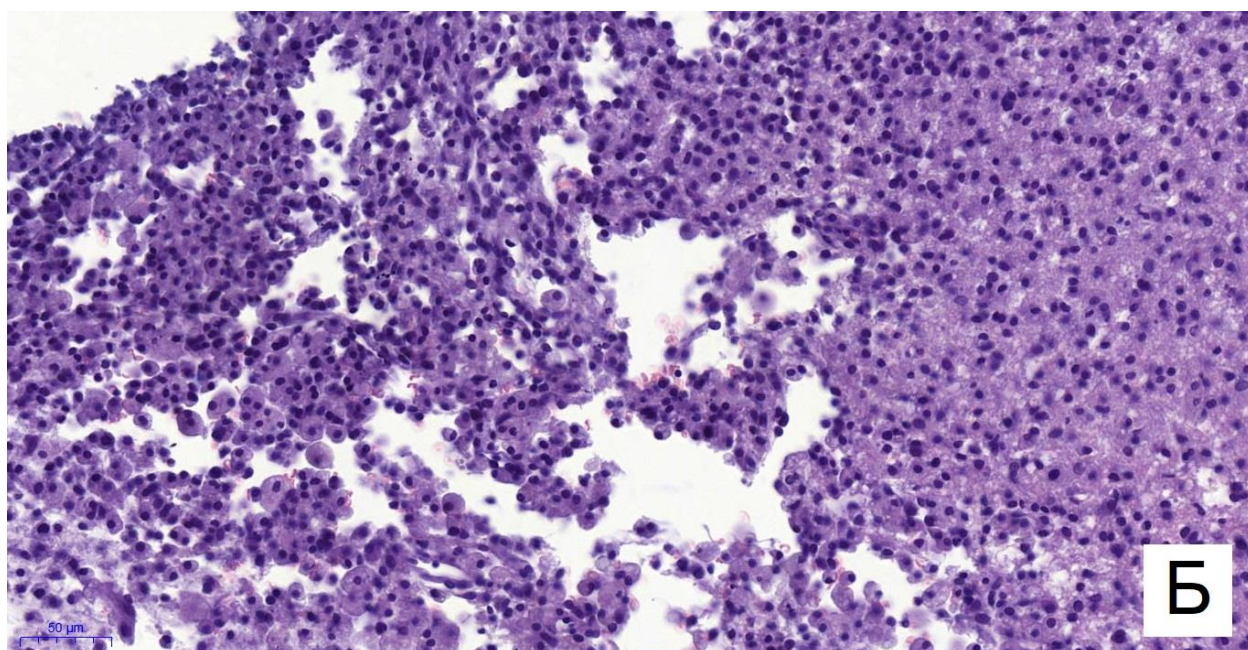


Рисунок 87. А - головной мозг здорового полушария травмированных животных на 7-е сутки после травмы. Цитоархитектоника коры сохранена, периваскулярные пространства резко расширены; Б - головной мозг травмированного полушария животных на 7-е сутки после травмы. Ткань мозга разрушена, замещена грануляционной тканью с большим количеством зернистых шаров; В - Ткань головного мозга травмированного полушария животных, которым вводили мафедин в дозе 2,5 мг/кг в течение 7 дней. Ткань мозга разрушена, нейропил несколько разрежен, количество глиальных клеток и мак-

рофагов не увеличено. А, Б, В – Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

### 3.2.4 Влияние изучаемых соединений на белковый состав спинномозговой жидкости крыс после ЧМТ

У крыс, перенесших черепно-мозговую травму, на 7 сутки наблюдали достоверное увеличение содержание общего белка по сравнению с контрольными животными ( $p=0,0426$ ). При электрофоретическом разделении белков СМЖ крыс отчетливо определялись полосы белков, которые можно условно разделить на несколько диапазонов относительно их молекулярных масс. У травмированных животных наблюдали достоверное увеличение фракций 60, 61 и 69-85 кДа. Ни мафедин, ни клонидин, не оказывали достоверного влияния на содержание общего белка в СМЖ и его фракций (Таблица 15).

Таблица 15 – Содержание общего белка (ОБ) и его фракций в СМЖ крыс на 7-е сутки после травмы

Показатель	Интактные	Контроль (травма)	ФДЭС, 10 мг/кг	Мафедин, 2,5 мг/кг	Клонидин
ОБ, мкг/мл	212,0 $\pm$ 24,1	432,7 $\pm$ 60,9#	259,9 $\pm$ 33,0*	555,9 $\pm$ 108,0	324,0 $\pm$ 26,4
165-260 кДа	50,6 $\pm$ 24,8	92,6 $\pm$ 23,7	25,3 $\pm$ 12,4	190,4 $\pm$ 49,9	74,0 $\pm$ 30,2
135-150 кДа	51,9 $\pm$ 10,6	134,6 $\pm$ 45,8	66,5 $\pm$ 18,0	166,2 $\pm$ 56,5	81,1 $\pm$ 9,3
69-85 кДа	65,7 $\pm$ 25,5	193,3 $\pm$ 18,1#	68,1 $\pm$ 14,8*	108,5 $\pm$ 37,3	109,2 $\pm$ 33,4
61 кДа	16,6 $\pm$ 5,3	46,9 $\pm$ 10,3#	27,0 $\pm$ 8,8	41,8 $\pm$ 3,0	30,1 $\pm$ 11,9
60 кДа	27,2 $\pm$ 7,9	100,8 $\pm$ 29,5#	45,8 $\pm$ 11,9	110,8 $\pm$ 13,5	49,7 $\pm$ 12,3

Примечание: # -  $p < 0,05$  - достоверное отличие от интактных животных по критерию Крускалля-Уоллиса; \* -  $p < 0,05$  - достоверное отличие от соответствующего контрольного показателя по критерию Крускалля-Уоллиса.

Отсутствие влияния мафедина на общий белок и белковый состав СМЖ травмированных крыс позволяет говорить о том, что его положительный эффект не связан с нормализацией проницаемости ГЭБ. Введение производного этаноламина уменьшало количество белков массой 69-85 кДа, кроме того, наблюдалась тенденция к уменьшению фракций 60 и 61 кДа, т.е. в целом, уменьшается количество белков в СМЖ, которые являются показателями травмы. Данные результаты могут свидетельствовать о том, что ФДЭС способен нормализовать нарушенную барьерную функцию ГЭБ после ЧМТ.

Проведенными исследованиями установлено, что мафедин улучшал функцию передних и задних конечностей крыс в тестах «Стимулирование конечностей» и «Сужающаяся дорожка», однако не оказывал достоверного эффекта на частоту использования контрлатеральной конечности в тестах «Цилиндр» и «Staircase». Такая избирательность действия может быть связана с тем, что он действует только на определенные системы в пределах ЦНС, иницирующие и/или контролирующие движения. При выполнении тестов «Стимулирование конечностей» и «Сужающаяся дорожка» участвует в большей степени экстрапирамидная система и спинально-стволовые рефлексы, в то время как в тестах «Цилиндр» и «Staircase» реализует свое действие пирамидная система, одной из ключевых функциональных структур которой является двигательная кора. Полученные результаты позволяют предполагать, что мафедин реализует свое действие именно через модуляцию спинально-стволовых рефлексов. Данное предположение может быть подкреплено тем, что другие агонисты альфа-2 адренорецепторов участвуют в инициации и/или модуляции локомоторных и постуральных рефлексов

(Musienko, P., 2011), которые по своему происхождению являются спинально-стволовыми (Bernstein, N. A., 1967).

Несмотря на данную избирательность действия, в тестах «Цилиндр» и «Сужающаяся дорожка» наблюдалась некоторая положительная динамика, например, в Эксперименте 2 в тесте «Цилиндр» мафедин улучшал двигательную функцию передней лапы. Данные эффекты можно объяснить тем, что мафедин все же в некоторой степени действует на работу пирамидной системы, что не противоречит предположению о его действии на спинально-стволовые рефлексy, хотя, в двигательной коре крыс в большей степени преобладают альфа-1 адренорецепторы (Zilles, K., 1991).

Наиболее вероятным объяснением данной особенности действия мафедина представляется то, что при моделировании травмы глубина повреждения головного мозга у крыс была достаточно большой. Тем самым, двигательная кора попадала не в область «полутени», а в область ядра, т.е. очага некроза, следовательно, тестируемые соединения уже не могли оказать нейропротекторного действия, и в тестах, где в большей степени требовалось участия коры, животные, которым вводили мафедин или клонидин, были не способны показать достаточно высокого результата.

В отличие от клонидина мафедин увеличивал общую двигательную активность травмированных крыс в тесте ОП. Увеличение ОДА может свидетельствовать о психостимулирующем действии, что в классическом понимании является нехарактерным для агонистов альфа-2 адренорецепторов (Wrenn, C. C., 2015). Это различие в спектре фармакологического действия, возможно, обусловлено тем, что мафедин может действовать на другие подтипы альфа-2 адренорецепторов, в отличие от клонидина. Клонидин в большей степени активен по отношению к альфа-2<sub>A</sub> адренорецепторам (Jasper, J. R., 1998), хотя, в классическом понимании, он является неизбирательным агонистом. В то же время, в проводимых тестах множественное сравнение не показало достоверной разницы между результатами групп мафедина в дозе

2,5 мг/кг и клонидина. Несмотря на то, что доза клонидина была выбрана исходя из того, что на моделях ишемии головного мозга доза клонидина 40 мкг/кг указывается как наиболее эффективная (Zhang, Y., 2004), снижение или увеличение дозы может привести к тому, что эффекты мафедина и клонидина будут одинаковыми. Данное предположение подтверждается тем, что клонидин в зависимости от дозы может вызывать у экспериментальных животных как анксиогенное, так и анксиолитическое действие (Silva, R. N., 2004). Дозозависимость эффекта наблюдалась и у мафедина: доза 2,5 мг/кг, в отличие от дозы 5 мг/кг, увеличивала общую двигательную активность травмированных животных.

Ни мафедин, ни клонидин не изменяли времени нахождения крыс с ЧМТ в центре, в открытых и закрытых рукавах, а также ОДА в тесте ПКЛ, что может говорить о том, что в данных дозах при курсовом введении изучаемые соединения не оказывают влияния на поведение травмированных животных.

Поскольку йохимбин отменял положительные эффекты мафедина в тестах «Стимулирование конечностей» и ОП, можно говорить, что улучшение функций передних и задних конечностей, а также увеличение общей двигательной активности животных обусловлено действием мафедина на альфа-2 адренорецепторы. Важно, что в тесте ПКЛ при одновременном введении с мафедином йохимбина у животных снижались время в открытых рукавах, а также ОДА, что может быть связано с тем, что йохимбин блокирует не только альфа-2 адренорецепторы, но также и различные подтипы серотониновых рецепторов (Nacif-Coelho, S., 1994). Снижение серотонинергической иннервации в головном мозге у крыс приводит к депрессивно- и тревожно-подобному поведению (Albert, P. R., 2014), которое может проявляться в снижении времени нахождения в открытых рукавах и снижению общей двигательной активности в тесте ПКЛ (Walf, A A, 2007).

Предполагается, что возможными механизмами нейропротекторного действия клонидина и других средств данной группы могут быть:

1) снижение избыточного выброса норадреналина и глутамата из синапсов нейронов при возникающем энергетическом дисбалансе (Scanziani, M., 1993; Talke, P., 1996);

2) закрытие потенциал-зависимых кальциевых каналов, открываемых при NMDA-деполяризации и вызывающих избыточное накопление  $Ca^{2+}$  в нейронах. Ранее было установлено, что NMDAR-опосредованные  $Ca^{2+}$  токи внутрь клеток активируются, когда тирозиновые остатки NMDAR2A и NMDAR2B находятся в фосфорилированном состоянии (Cheung, H. H., 2003). Yanli L. et al. на модели окклюзии СМА у крыс показали, что предварительное недельное введение клонидина приводит к увеличению экспрессии p-NMDAR1 и уменьшению экспрессии p-NMDAR2A и NMDAR2A в коре тестируемых животных, что сопровождается снижением объемов повреждения головного мозга (Yanli, L., 2016).

3) активация G-белок-связанных калиевых каналов внутреннего выпрямления с последующей гиперполяризацией клеточной мембраны (Donello, J. E., 2001);

4) ингибирование аденилат- и гуанилатциклазы (Goldstein, D. S., 1997; Hein, L., 1995).

5) стимуляция синтеза трофических факторов в ЦНС. Имеются данные о том, что клонидин, как и другой агонист альфа-2 адренорецепторов, ксилазин, способны увеличивать экспрессию мРНК основного фактора роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF) в сетчатке глаз у крыс, оказывая ретинопротекторное действие. Введение йохимбина блокировало положительный эффект альфа-2 агонистов (Wen, R., 1996). Матричная РНК данного трофического фактора также обнаружена и в пределах головного мозга у крыс, а именно: в коре (фронтальной, париетальной и затылочной областях), гиппокампе, гипоталамусе и в варолиевом мосту (Emoto, N., 1989).

Нейропротекторное действие bFGF было неоднократно продемонстрировано на экспериментальных моделях повреждения головного (Zhao, Y. Z., 2016) и спинного (Hodgetts, S. I., 2017; Lee, T. T., 1999; Rabchevsky, A. G., 1999) мозга у крыс.

Среди агонистов альфа-2 адренорецепторов не только клонидин, но и другие средства, возбуждающие данные рецепторы показывали нейропротекторную активность в условиях эксперимента. Так, Hoffman W.E. et al. оценивали активность дексмедетомидина при введении за 30 минут до моделирования церебральной ишемии у крыс. Группы животных, получавших данное средство, имели достоверно лучшее функциональное состояние и меньший объем ишемического повреждения головного мозга по сравнению с контролем на 3-е сутки после операции. Интересно, что нейропротекторная активность дексмедетомидина имела дозозависимый характер (100 мг/кг были эффективнее 10 мг/кг) и блокировалась в случае одновременного введения с ним атипамезола, антагониста альфа-2 адренорецепторов (Hoffman, W. E., 1991).

В клинической практике было показано, что дексмедетомидин способен снижать выброс ФНО- $\alpha$  и IL-6, подавлять секрецию нейронспецифической енолазы (NSE) и белка S100 $\beta$ , поддерживать высокий уровень активности супероксиддисмутазы и снижать выброс кортизола и глюкозы у пациентов с ишемией головного мозга. Более того, при введении данного агониста альфа-2 адренорецепторов достигалась стабильность церебральной гемодинамики и уменьшение внутричерепного давления (Jiang, L., 2017).

ФНО- $\alpha$  и интерлейкины-6 и 1 $\beta$  являются ключевыми медиаторами воспаления нервной системы и их подъем происходит незамедлительно в острую фазу ишемии головного мозга (Kumar, R. G., 2015; Sriram, K., 2007; Zaremba, J., 2004). Адекватный выброс воспалительных медиаторов является средством иммунного ответа, защиты и даже нейропротекции (Sriram, K.,

2007). Однако, в случае, когда нарушается баланс между про- и противовоспалительными реакциями, возникает набухание нервных клеток и последующий их некроз с присущими функциональными нарушениями.

Например, известно, что ФНО- $\alpha$  участвует в защитных реакциях нейронов, способствуя их выживанию, пролиферации и росту, демонстрируя роль потенциального нейропротектора. С другой стороны, при повреждении головного мозга наблюдается рост данного фактора, что приводит к нейродегенерации и развитию воспалительных процессов, повышению уровней интерлейкинов-6 и 8, а также других цитокинов, способствующих неблагоприятному исходу (Sriram, K., 2007). Таким образом, ФНО- $\alpha$  имеет двойную роль в головном мозге, что может быть обусловлено в том числе и индивидуальными различиями в количестве и чувствительности рецепторов к данному фактору (Jiang, L., 2017). Имеются данные о том, что подъем уровня ФНО- $\alpha$  можно наблюдать в головном мозге, спинномозговой жидкости и сыворотке пациентов с болезнью Альцгеймера (Grammas, P., 2011), болезнью Паркинсона (Kempuraj, D., 2016) и черепно-мозговой травмой (Woodcock, T., 2013).

NSE и S100 $\beta$  являются чувствительными биомаркерами ишемического и травматического повреждения головного мозга, секретлируемыми нейронами, нейроэндокринными клетками и глиальными элементами. Имеются сведения, что S100 $\beta$  не только является следствием повреждения, но также способен ухудшать течение воспалительных процессов в тканях мозга. Например, это может быть связано с тем, что данный белок индуцирует экспрессию NO-синтетазы и вызывает выброс других воспалительных цитокинов, воздействуя на сигнальные пути их активации (Edwards, M. M., 2006; Korfias, S., 2006).

Поскольку мафедин не уменьшал содержание общего белка спинномозговой жидкости у травмированных крыс, а также не снижал содержание ни одной из основных фракций белков, можно говорить о том, что механизм



положительного действия мафедина не связан с нормализацией проницаемости ГЭБ.

Морфологический анализ показал, что введение мафедина животным, перенесшим черепно-мозговую травму, приводит к снижению интенсивности воспаления в области повреждения. Скорее всего, данный эффект является не самостоятельным, а следствием снижения выброса провоспалительных факторов (например ФНО- $\alpha$  и IL-6), т.е., снижение интенсивности воспалительного процесса под влиянием альфа-2 адреномиметиков при повреждении головного мозга (Jiang, L., 2017).

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. При этом происходит уменьшение объема повреждения головного мозга и снижение выраженности воспалительных процессов в области повреждения. В сравнении с клонидином при данном режиме введения, мафедин более эффективен в большинстве тестов. Йохимбин отменяет большинство положительных эффекты изучаемого соединения, что позволяет говорить о том, что в положительном эффекте последнего принимают участие альфа-2 адренорецепторы. Отсутствие влияния мафедина на общий белок и белковый состав СМЖ травмированных крыс позволяет говорить о том, что его положительный эффект не связан с нормализацией проницаемости ГЭБ.

Положительный эффект аминоктанольных холинотропных средств при ЧМТ может быть обусловлен различными механизмами.

Во-первых, благодаря субстратному механизму действия происходит увеличение образование ацетилхолина, выполняющего важную нейротрансмиттерную роль в пределах головного мозга. Кроме того, накапливающийся АХ может действовать не только в пределах синапса и синаптической щели, но и диффузно распространяться парасинаптически, оказывая дополнитель-

ные эффекты (Descarries, L., 1997), включающие нейропротекторное действие (Hashimoto, M., 2005; O'Neill, M. J., 2002), стимуляцию нейрогенеза (Cooper-Kuhn, C. M., 2004), индукцию нейрональной пластичности и функциональную перестройку коры головного мозга (Gu, Q., 2003; Kilgard, M. P., 1998).

Изучаемые производные этаноламина улучшали ответ конечностей на тактильную и проприорецептивную стимуляцию, увеличивали частоту использования контролатеральной конечности, способствовали нормализации моторно-координационной функции, а также увеличивали общую двигательную и поисково-исследовательскую активность травмированных крыс. При этом изменения в поведении наблюдались только у животных, которым вводились данные ЛС в субстратных дозах (холина альфосцерат и цитиколин).

Поскольку ФДЭС оказывал нейрореабилитационное действие в несубстратных дозах, можно предположить, что положительный эффект данного средства связан не только с возможным накоплением ацетилхолина, но и с имеющимися в строении молекулы остатками фумарата и сукцината. Однако для действия фумарата и сукцината как субстратов цикла трикарбоновых кислот требуются их высокие концентрации, что противоречит полученным в данном исследовании результатам. Кроме того, малоновая кислота, антагонист янтарной кислоты в дыхательной цепи, не снижал положительного эффекта ФДЭС в дозе 10 мг/кг у крыс, перенесших ЧМТ.

Возможно, что образующийся в процессе метаболизма молекулы ФДЭС сукцинат напрямую взаимодействует с сукцинатными рецепторами (SUCNR 1), расположенными в нейронах коры головного мозга. Как было показано, SUCNR 1 рецепторы участвуют в экспрессии основных проангиогенных факторов и регуляции активности NMDA рецепторов (Okovityi, S. V., 2015), что также может вносить вклад в нейропротекторное действие ФДЭС.

Также, не исключено, что комплекс производных этаноламина с субстратами цикла Кребса является эффективным носителем холиноподобных

соединений через гематоэнцефалический барьер, так как сопоставимые с цитиколином нейротропные эффекты отмечаются в существенно более низкой дозе (10 мг/кг для ФДЭС против 500 мг/кг для цитиколина).

Изучаемое производное этаноламина не снижало статистически значимо объем повреждения головного мозга крыс после ЧМТ по сравнению с контролем, однако у таких животных наблюдалось уменьшение общего белка СМЖ. Следовательно, положительный эффект изучаемого соединения может быть обусловлен его благотворным влиянием на нарушенную после травмы проницаемость ГЭБ.

Снижение общей двигательной активности и времени нахождения в открытых рукавах, а также увеличение времени нахождения в закрытом рукаве у травмированных животных на 7 день курсового введения холина альфосцерата и цитиколина в субстратных дозах можно связать с изменением баланса между центральными адренергическими и холинергическими влияниями. Janowsky D.S. et. al. выдвинули гипотезу, что холинергическая и адренергическая системы в пределах ЦНС работают реципрокно и выраженное превалирование холинергических влияний может приводить к развитию депрессивного состояния, в то время как преобладание катехоламинергических или серотонинергических – к формированию гиперактивности (Janowsky, D. S., 1972).

Исходя из того, что ФДЭС не оказывал влияния на поведение травмированных животных в тесте ПКЛ, можно сделать предположение, что данное средство не приводит к нарушению баланса между холинергической и адренергической системами в головном мозге.

Обращает на себя внимание дозозависимое различие в эффективности ФДЭС. Проведенными экспериментами установлено, что доза препарата 10 мг/кг превосходит по своей эффективности дозу 75 мг/кг. Возможно, такая закономерность является характерной для сукцинатсодержащих препаратов, так как ранее было показано, что профилактическое внутривенное введение

этилметилгидроксипиридина сукцината (Мексидол) в дозе 50 мг/кг уменьшает размер формирующегося инфаркта миокарда при окклюзии коронарной артерии, в отличие от дозы 100 мг/кг, использование которой не давало кардиопротекторного эффекта (Галагудза, М. М., 2009).

Сравнение профилей фармакологического эффекта изученных препаратов представлено на Рисунке 88. Анализ диаграммы показывает, что общая направленность действия всех изученных препаратов имеет сходные черты, а наибольшую эффективность - ФДЭС в дозе 10 мг/кг. Однако, достоверных различий между эффективностью ФДЭС в дозе 10 мг/кг и средствами сравнения, цитиколином и холина альфосцератом (в тестах, где они давали статистически значимые улучшения состояния животных по сравнению с контролем) не было. Кроме того, в тесте «Стимулирование конечностей» не наблюдалось достоверных различий между группами животных, получавших ФДЭС в дозе 10 мг/кг и 75 мг/кг.

Таким образом, применение нового производного диэтилэтаноламина 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).

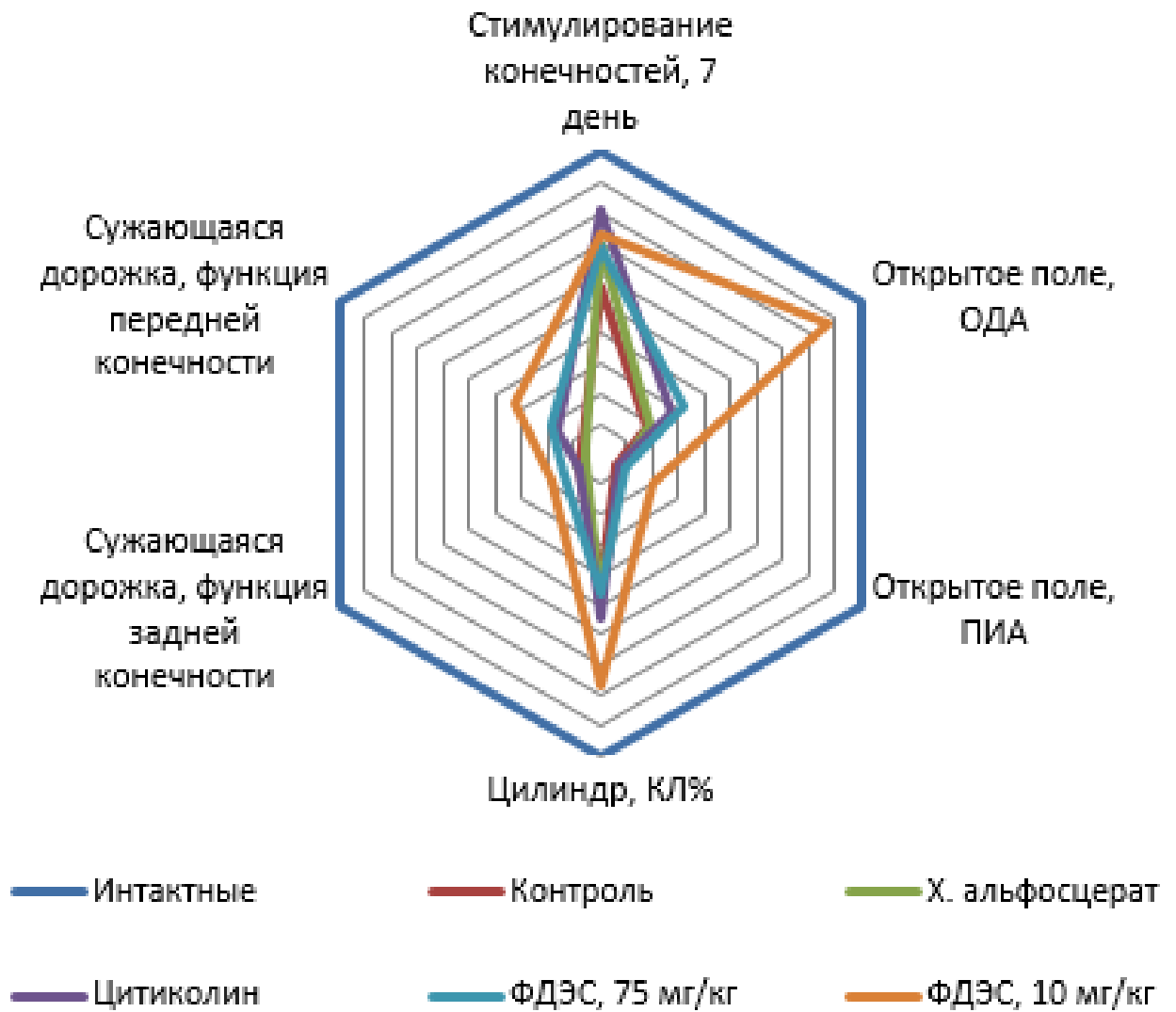


Рисунок 88 – Профиль фармакологической активности исследуемых лекарственных средств

## 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 акваримум», 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 контрлатеральных 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.

б) 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-и и 7-е сутки после травмы.

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



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова, Н.А. Фармакологическая характеристика мафедина : автореф. дисс. ... кандидата биол. наук : 14.03.06 / Анисимова Наталья Аскольдовна. – СПб., 1984. – 40 с.
2. Воронков, А.В. Моделирование черепно-мозговой травмы у крыс в условиях эксперимента. / Воронков А.В., Калашникова С.А., Хури Е.И., Д.И. П. // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 75.
3. Галагудза, М. М. Эффекты изолированного и комбинированного использования этилметилгидроксипиридина сукцината и ишемического preconditionирования на выраженность ишемического-реперфузионного повреждения миокарда у крыс. / Галагудза М.М., Сыренский А.В., Власов Т.Д., Морозова Л.Ю., Егорова Е.И., Полумисков В.Ю. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 3. – С. 22–26.
4. Дыгало, Н Н. Рецепторы гормонов, нейротрансмиттеров и тканевых факторов. / Дыгало Н.Н. // Учебное пособие к курсу «Гормоны в фило- и онтогенезе». Новосибирск: Изд-во НГО, – 2001.
5. Титович, И.А. Нейротропная активность нового производного аминоэтанола в условиях экспериментальной ишемии головного мозга. / Титович И.А., Сысоев Ю.И., Болотова В.Ц., С.В. О. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 5. – С. 3–6.
6. Титович, И.А. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминоэтанола. / Титович И.А., Болотова В.Ц. // Биомедицина. – 2016. – Т. 2. – С. 77–83.
7. Шубина, О.С. Изменение поведения крыс при интоксикации свинцом и черепно-мозговой травме в тесте «Открытое поле». / Шубина О.С., Егорова М.В. // E-SCIO. – 2017. – Т. 9, № 12. – С. 7–13.
8. Adams, J H. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. / Adams J.H., Doyle D., Ford I., Gennarelli T.A., Graham D.I., McLellan D.R. // Histopathology. – 1989. – Т. 15, № 1. – P. 49–59.

9. Adibhatla, R. M. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. / Adibhatla R.M., Hatcher J.F. // *J. Neurosci. Res.* – 2003. – V. 73, № 3. – P. 308–315.
10. Adibhatla, R. M. Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. / Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J. // *Stroke.* – 2001. – V. 32, № 10. – P. 2376–2381.
11. Albert, P. R. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. / Albert P.R., Vahid-Ansari F., Luckhart C. // *Front. Behav. Neurosci.* – 2014.
12. Albertson, T. E. Is It Prime Time for Alpha2-Adrenoceptor Agonists in the Treatment of Withdrawal Syndromes? / Albertson T.E., Chenoweth J., Ford J., Owen K., Sutter M.E. // *J. Med. Toxicol.* – 2014. – V. 10, № 4. – P. 369–381.
13. Alves, J. L. Blood-brain barrier and traumatic brain injury. /Alves J.L. // *Journal of Neuroscience Research.* – 2014. – V. 92, № 2. – P. 141–147.
14. Amcheslavsky, V G. The use of citicoline (ceraxon) in the treatment of brain injuries. /Amcheslavsky V.G. // *Therapy.* – 2016. – V. 2, № 6. – P. 76–80.
15. Amenta, F. Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? /Amenta F., Parnetti L., Gallai V., Wallin A. // *Mechanisms of Ageing and Development.* – 2001. – V. 122, № 16. – P. 2025–2040.
16. Amorim, M. A. S. Effect of dexmedetomidine in children undergoing general anesthesia with sevoflurane: a meta-analysis. / Amorim M.A.S., Govêia C.S., Magalhães E., Ladeira L.C.A., Moreira L.G., Miranda D.B. de // *Brazilian J. Anesthesiol.* – 2017. – V. 67, № 2. – P. 193–198.
17. Ampatzis, K. Neuronal and glial localization of alpha(2A)-adrenoceptors in the adult zebrafish (*Danio rerio*) brain. / Ampatzis K., Kentouri M., Dermon C. // *J Comp Neurol.* – 2008. – V. 508, № 1. – P. 72–93.

18. Anden, N E. Different alpha-adrenoreceptors in the central nervous system mediating biochemical and functional effects of clonidine and receptor blocking agents. / Anden N.E., Grabowska M., Strfmbom U. // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* – 1976. – V. 292, № 1. – P. 43–52.

19. Ansell, G B. Studies on the origin of choline in the brain of the rat. / Ansell G.B., Spanner S. // *Biochem. J.* – 1971. – V. 122, № 5. – P. 741–750.

20. Baldwin, H A. Caffeine-induced angiogenesis: the role of adenosine, benzodiazepine and noradrenergic receptors. / Baldwin H.A., File S.E. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1989. – V. 32, № 1. – P. 181–186.

21. Baron, J. A. Cigarette smoking and Parkinson's disease. / Baron J.A. // *Neurology.* – 1986. – V. 36, № 11. – P. 1490–1490.

22. Barrett, K. M. Enhancing recovery after acute ischemic stroke with donepezil as an adjuvant therapy to standard medical care: Results of a phase iia clinical trial. / Barrett K.M., Brott T.G., Brown R.D., Carter R.E., Geske J.R., Graff-Radford N.R., McNeil R.B., Meschia J.F. // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* – 2011.

23. Bayir, H. Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: Support for a neuroprotective role of iNOS. / Bayir H., Kagan V.E., Borisenko G.G., Tyurina Y.Y., Janesko K.L., Vagni V.A., Billiar T.R., Williams D.L., Kochanek P.M. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2005. – V. 25, № 6. – P. 673–684.

24. Ben-Shlomo, Y. How far are we in understanding the cause of Parkinson's disease? / Ben-Shlomo Y. // *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry.* – 1996. – V. 61, № 1. – P. 4–16.

25. Beristain, X. Pharmacotherapy to Enhance Cognitive and Motor Recovery Following Stroke. / Beristain X., Golombievski E. // *Drugs Aging.* – 2015. – V. 32, № 10. – P. 765–772.

26. Bernstein, N. A. The co-ordination and regulation of movements: Conclusions towards the Study of Motor Co-ordination. / Bernstein N.A. //

Biodynamics of Locomotion. – 1967. – P. 104–113.

27. Bhattacharya, S K. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. / Bhattacharya S.K., Satyan K.S., Chakrabarti A. // J. Psychopharmacol. – 1997. – V. 11, № 3. – P. 219–224.

28. Bidwell, L. C. Cognitive enhancers for the treatment of ADHD. / Bidwell L.C., McClernon F.J., Kollins S.H. // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 2011. – V. 99, № 2. – P. 262–274.

29. Björklund, M.  $\alpha$ 2C-Adrenoceptor-Overexpressing Mice Are Impaired in Executing Nonspatial and Spatial Escape Strategies. / Björklund M., Sirviö J., Puoliväli J., Sallinen J., Jäkälä J., Scheinin M., Kobilka B.K., P. R. // Mol. Pharmacol. – 1998. – V. 54, № 3. – P. 569–576.

30. Boehnlein, J. K. Pharmacologic reduction of CNS noradrenergic activity in PTSD: The case for clonidine and prazosin. / Boehnlein J.K., Kinzie J.D. // Journal of Psychiatric Practice. – 2007. – V. 13, № 2. – P. 72–78.

31. Boyeson, M G. Spraying of motor function after cortical injury: a new perspective on underlying mechanisms. / Boyeson M.G., Jones J.L., Harmon R.L. // Arch Neurol. – 1994. – V. 51, № 4. – P. 405–14.

32. Bradshaw, C M. The effect of microelectrophoretically applied clonidine on single cerebral cortical neurons in rat; evidence for interaction with alpha-1- adrenoceptors. / Bradshaw C.M., Stoker M.J., Szabadi E. // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. – 1982. – V. 320, № 3. – P. 230–234.

33. Bramlett, H. M. Posttraumatic brain hypothermia provides protection from sensorimotor and cognitive behavioral deficits. / Bramlett H.M., Green E.J., Dietrich W.D., Busto R., Globus M.Y.T., Ginsberg M.D. // J Neurotrauma. – 1995. – V. 12, № 3. – P. 289–98.

34. Bullock, R. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. / Bullock R., Zauner a, Woodward J.J., Myseros J., Choi S.C., Ward J.D., Marmarou a, Young H.F. // J. Neurosurg. – 1998. – V. 89, № 4. – P. 507–518.

35. Bussel, B. Late flexion reflex in paraplegic patients. Evidence for a spinal stepping generator. / Bussel B., Roby-Brami A., Yakovleff A., Bennis N. // *Brain Res. Bull.* – 1989. – V. 22, № 1. – P. 53–56.
36. Chau, C. Early locomotor training with clonidine in spinal cats. / Chau C., Barbeau H., Rossignol S. // *J. Neurophysiol.* – 1998. – V. 79, № 1. – P. 392–409
37. Chau, C. Effects of intrathecal alpha1- and alpha2-noradrenergic agonists and norepinephrine on locomotion in chronic spinal cats. / Chau C., Barbeau H., Rossignol S. // *J Neurophysiol.* – 1998. – V. 79, № 6. – P. 2941–2963.
38. Cheung, H. H. Inhibition of protein kinase C reduces ischemia-induced tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor. / Cheung H.H., Teves L., Wallace M.C., Gurd J.W. // *J. Neurochem.* – 2003. – V. 86, № 6. – P. 1441–1449.
39. Clark, R S. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. / Clark R.S., Schiding J.K., Kaczorowski S.L., Marion D.W., Kochanek P.M. // *J Neurotrauma.* – 1994. – V. 11, № 5. – P. 499–506.
40. Clark, R.S.B. Cerebrospinal fluid adenosine concentration and uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism after severe head injury in humans. / Clark R.S.B., Carcillo J.A., Kochanek P.M., Obrist W.D., Jackson E.K., Mi Z., Wisniewski S.R., Bell M.J., Marion D.W. // *Neurosurgery.* – 1997. – V. 41, № 6. – P. 1284–1293.
41. Cohen, E. L. Brain acetylcholine: Increase after systematic choline administration. / Cohen E.L., Wurtman R.J. // *Life Sci.* – 1975. – V. 16, № 7. – P. 1095–1102.
42. Cooper-Kuhn, C. M. Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. / Cooper-Kuhn C.M., Winkler J., Kuhn H.G. // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – V. 77, № 2. – P. 155–165.
43. Cornford, E. M. Carrier mediated blood-brain barrier transport of

choline and certain choline analogs. / Cornford E.M., Braun L.D., Oldendorf W.H. // *J. Neurochem.* – 1978. – V. 30, № 2. – P. 299–308.

44. Cunningham, A. S. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. / Cunningham A.S., Salvador R., Coles J.P., Chatfield D.A., Bradley P.G., Johnston A.J., Steiner L.A., Fryer T.D., Aigbirhio F.I., Smielewski P., Williams G.B., Carpenter T.A., Gillard J.H., Pickard J.D., Menon D.K. // *Brain.* – 2005. – V. 128, № 8. – P. 1931–1942.

45. Davis, K. L. Choline in tardive dyskinesia and Huntington's disease. / Davis K.L., Hollister L.E., Barchas J.D., Berger P.A. // *Life Sci.* – 1976. – V. 19, № 10. – P. 1507–1515.

46. Davis, P. J. *Smith's Anesthesia for Infants and Children.* / Davis P.J., Cladis F.P., Motoyama E.K. 8th изд. Elsevier, – 2011.

47. De Ryck, M. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. / De Ryck M., Van Reempts J., Borgers M., Wauquier A., Janssen P.A. // *Stroke.* – 1989. – V. 20, № 10. – P. 1383–1390.

48. Demin, K. A. Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes. / Demin K.A., Kolesnikova T.O., Khatsko S.L., Meshalkina D.A., Efimova E. V., Morzherin Y.Y., Kalueff A. V. // *Neurotoxicol. Teratol.* – 2017. – V. 62. – P. 27–33.

49. Descarries, L. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. / Descarries L., Gisiger V., Steriade M. // *Progress in Neurobiology.* – 1997. – V. 53, № 5. – P. 603–625.

50. Di Chiara, G. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. / Di Chiara G., Morelli M., Consolo S. // *Trends in Neurosciences.* – 1994. – V. 17, № 6. – P. 228–233.

51. Diederich, K. Citicoline enhances neuroregenerative processes after

experimental stroke in rats. / Diederich K., Frauenknecht K., Minnerup J., Schneider B.K., Schmidt A., Altach E., Eggert V., Sommer C.J., Schäbitz W.R. // *Stroke*. – 2012. – V. 43, № 7. – P. 1931–1940.

52. Dietz, V. Locomotor capacity of spinal cord in paraplegic patients. / Dietz V., Colombo G., Jensen L., Baumgartner L. // *Ann Neurol*. – 1995. – V. 37, № 5. – P. 574–582.

53. Diringer, M N. No reduction in cerebral metabolism as a result of early moderate hyperventilation following severe traumatic brain injury. / Diringer M.N., Yundt K., Videen T.O., Adams R.E., Zazulia a R., Deibert E., Aiyagari V., Dacey R.G., Grubb R.L., Powers W.J. // *J. Neurosurg*. – 2000. – V. 92, № 1. – P. 7–13.

54. Dixon, C. E. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. / Dixon C.E., Lyeth B.G., Povlishock J.T., Findling R.L., Hamm R.J., Marmarou A., Young H.F., Hayes R.L. // *J Neurosurg*. – 1987. – V. 67, № 1. – P. 110–119.

55. Donello, J. E. alpha(2)-Adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation and preserve retinal function after transient ischemia. / Donello J.E., Padillo E.U., Webster M.L., Wheeler L.A., Gil D.W. // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. – 2001. – V. 296, № 1. – P. 216–223.

56. Du, W. Inhibition of TRPC6 degradation suppresses ischemic brain damage in rats. / Du W., Huang J., Yao H., Zhou K., Duan B., Wang Y. // *J. Clin. Invest*. – 2010. – V. 120, № 10. – P. 3480–3492.

57. Dudek, M. A comparison of the anorectic effect and safety of the alpha2-adrenoceptor ligands guanfacine and yohimbine in rats with diet-induced obesity. / Dudek M., Knutelska J., Bednarski M., Nowiński L., Zygmunt M., Mordyl B., Głuch-Lutwin M., Kazek G., Sapa J., Pytka K. // *PLoS One*. – 2015. – V. 10, № 10.

58. Duttaroy, A. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. / Duttaroy A., Gomeza J., Gan

J.-W., Siddiqui N., Basile A.S., Harman W.D., Smith P.L., Felder C.C., Levey A.I., Wess J. // *Mol. Pharmacol.* – 2002. – V. 62, № 5. – P. 1084–1093.

59. Edwards, M. M. TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: Implications for Alzheimer's disease. / Edwards M.M., Robinson S.R. // *J. Neural Transm.* – 2006. – V. 113, № 11. – P. 1709–1715.

60. Egan, R. J. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. / Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., Cachat J.M., Canavello P.R., Elegante M.F., Elkhayat S.I., Bartels B.K., Tien A.K., Tien D.H., Mohnot S., Beeson E., Glasgow E., Amri H., Zukowska Z., Kalueff A. V. // *Behav. Brain Res.* – 2009. – V. 205, № 1. – P. 38–44.

61. Ellison, P H. Propranolol for severe post-head injury action tremor. / Ellison P.H. // *Neurology.* – 1978. – V. 28, № 2. – P. 197–199.

62. Emoto, N. Basic fibroblast growth factor (FGF) in the central nervous system: Identification of specific loci of basic FGF expression in the rat brain. / Emoto N., Gonzalez A.M., Walicke P.A., Wada E., Simmons D.M., Shimasaki S., Baird A. // *Growth Factors.* – 1989. – V. 2, № 1. – P. 21–29.

63. Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. / Ferrara N. // *Kidney International.* – 1999. – V. 56, № 3. – P. 794–814.

64. Fontana, B. D. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. / Fontana B.D., Mezzomo N.J., Kalueff A. V., Rosemberg D.B. // *Experimental Neurology.* – 2018. – V. 299. – P. 157–171.

65. Formisano, R. Posttraumatic parkinsonism. / Formisano R., Zasler N.D. // *Journal of Head Trauma Rehabilitation.* – 2014. – V. 29, № 4. – P. 387–390

66. Freedman, R. Alpha-bungarotoxin binding to hippocampal interneurons: immunocytochemical characterization and effects on growth factor expression. / Freedman R., Wetmore C., Stromberg I., Leonard S., Olson L. // *J Neurosci.* – 1993. – V. 13, № 5. – P. 1965–1975.



67. Freeman, J. J. The source of choline for acetylcholine synthesis in brain. / Freeman J.J., Jenden D.J. // *Life Sciences*. – 1976. – V. 19, № 7. – P. 949–961.
68. Fujimoto, S. T. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. / Fujimoto S.T., Longhi L., Saatman K.E., Conte V., Stocchetti N., McIntosh T.K. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2004. – V. 28, № 4. – P. 365–378.
69. Gerber, D. J. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. / Gerber D.J., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Huang S.Y., Caron M.G., Tonegawa S. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – V. 98, № 26. – P. 15312–15317.
70. Giovannitti, J. A. Alpha-2 adrenergic receptor agonists: a review of current clinical applications. / Giovannitti J.A., Thoms S.M., Crawford J.J. // *Anesth. Prog.* – 2015. – V. 62, № 1. – P. 31–39.
71. Giuli, C. Morphometric studies on synapses of the cerebellar glomerulus: The effect of centrophenoxine treatment in old rats. / Giuli C., Bertoni-Freddari C., Pieri C. // *Mech. Ageing Dev.* – 1980. – V. 14, № 1–2. – P. 265–271.
72. Glenn, T. C. Energy Dysfunction as a Predictor of Outcome after Moderate or Severe Head Injury: Indices of Oxygen, Glucose, and Lactate Metabolism. / Glenn T.C., Kelly D.F., Boscardin W.J., McArthur D.L., Vespa P., Oertel M., Hovda D.A., Bergsneider M., Hillered L., Martin N.A. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2003. – V. 23, № 10. – P. 1239–1250.
73. Goldstein, D. S. Catecholamine Receptors and Signal Transduction. / Goldstein D.S. // *Adv. Pharmacol.* – 1997. – V. 42, № C. – P. 379–390.
74. Goll, D. E. The Calpain System. / Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. // *Physiol. Rev.* – 2003. – V. 83, № 3. – P. 731–801.
75. Gomeza, J. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. /

Gomez J., Zhang L., Kostenis E., Felder C., Bymaster F., Brodtkin J., Shannon H., Xia B., Deng C., Wess J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1999. – V. 96, № 18. – P. 10483–10488.

76. Gomez J. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. / Gomez J., Shannon H., Kostenis E., Felder C., Zhang L., Brodtkin J., Grinberg A., Sheng H., Wess J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1999. – V. 96, № 4. – P. 1692–1697.

77. Grammas, P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. / Grammas P. // *Journal of Neuroinflammation.* – 2011. – V. 8. – P. 26.

78. Griffin, S. L. A Review of Cholinergic Agents in the Treatment of Neurobehavioral Deficits Following Traumatic Brain Injury. / Griffin S.L., van Reekum R., Masanic C. // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* – 2003. – V. 15, № 1. – P. 17–26.

79. Gu, Q. Contribution of acetylcholine to visual cortex plasticity. / Gu Q. // *Neurobiology of Learning and Memory.* – 2003. – V. 80, № 3. – P. 291–301.

80. Gutiérrez-Fernández, M. CDP-choline treatment induces brain plasticity markers expression in experimental animal stroke. / Gutiérrez-Fernández M., Rodríguez-Frutos B., Fuentes B., Vallejo-Cremades M.T., Álvarez-Grech J., Expósito-Alcaide M., Díez-Tejedor E. // *Neurochem. Int.* – 2012. – V. 60, № 3. – P. 310–317.

81. Hamm, R J. Cognitive deficits following traumatic brain injury by controlled cortical impact. / Hamm R.J., Dixon C.E., Gbadebo D.M., Singha A.K., Jenkins L.W., Lyeth B.G., Hayes R.L. // *J Neurotrauma.* – 1992. № 9. – P. 11–20.

82. Hanson, M. G. Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. / Hanson M.G., Landmesser L.T. // *J. Neurosci.* – 2003. – V. 23, № 2. – P. 587–600.

83. Harmon, R. L. Treatment of post-traumatic midbrain resting-kinetic tremor with combined levodopa/carbidopa and carbamazepine. / Harmon R.L.,

Long D.F., Shirtz J. // *Brain Inj.* – 1991. – V. 5, № 2. – P. 213–218.

84. Hashimoto, M. Does donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease? / Hashimoto M., Kazui H., Matsumoto K., Nakano Y., Yasuda M., Mori E. // *Am. J. Psychiatry.* – 2005. – V. 162, № 4. – P. 676–682.

85. Haubrich, D. R. Increase in rat brain acetylcholine induced by choline or deanol. / Haubrich D.R., Wang P.F., Clody D.E. // *Life Sci.* – 1975. – V. 17, № 6. – P. 975–980.

86. Hein, L. Adrenergic receptor signal transduction and regulation. / Hein L., Kobilka B.K. // *Neuropharmacology.* – 1995. – V. 34, № 4. – P. 357–366

87. Hodgetts, S.I. Neurotrophic Factors Used to Treat Spinal Cord Injury. / Hodgetts S.I., Harvey A.R. // *Vitamins and hormones.* – 2017. – V. 104. – P. 405–457.

88. Hoffman, W. E. Dexmedetomidine improves neurologic outcome from incomplete ischemia in the rat. Reversal by the  $\alpha$ 2-adrenergic antagonist atipamezole. / Hoffman W.E., Kochs E., Werner C., Thomas C., Albrecht R.F. // *Anesthesiology.* – 1991. – V. 75, № 2. – P. 328–332.

89. Howe, K. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. / Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Stemple D.L., // *Nature.* – 2013. – V. 496, № 7446. – P. 498–503.

90. Huang, A. Spinal cholinergic neurons activated during locomotion: localization and electrophysiological characterization. / Huang A., Noga B.R., Carr P.A., Fedirchuk B., Jordan L.M. // *J. Neurophysiol.* – 2000. – V. 83, № 6. – P. 3537–3547.

91. Hunter, J C. Assessment of the role of alpha-2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. / Hunter J.C., Fontana D.J., Hedley L.R., Jasper J.R., Lewis R., Link R.E., Seechi R., Sutton J., Eglen R.M. // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – V. 122, № 7. – P. 1339–1344.

92. Hurtado, O. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: Effects on glutamate transport. / Hurtado O., Moro M.A., Cárdenas A., Sánchez V., Fernández-Tomé P., Leza J.C., Lorenzo P., Secades J.J., Lozano R., Dávalos A., Castillo J., Lizasoain I. // *Neurobiol. Dis.* – 2005. – V. 18, № 2. – P. 336–345.

93. Illingworth, D. R. The uptake and metabolism of plasma lysophosphatidylcholine in vivo by the brain of squirrel monkeys. / Illingworth D.R., Portman O.W. // *Biochem. J.* – 1972. – V. 130, № 2. – P. 557–567.

94. Isaev, N. K. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQR1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat. / Isaev N.K., Novikova S. V, Stelmashook E. V, Barskov I. V, Silachev D.N., Khaspekov L.G., Skulachev V.P., Zorov D.B. // *Biochemistry. (Mosc).* – 2012. – V. 77, № 9. – P. 996–999.

95. Jacob, P. C. Posttraumatic rubral tremor responsive to clonazepam. / Jacob P.C., Chand R.P. // *Mov. Disord.* – 1998. – V. 13, № 6. – P. 977–978.

96. Jacobson, S. A. Donepezil: potential neuroprotective and disease-modifying effects. / Jacobson S.A., Sabbagh M.N. // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* – 2008.

97. Jankovic, J. Parkinson's disease and movement disorders: moving forward. / Jankovic J. // *Lancet Neurol.* – 2008. – V. 7, № 1. – P. 9–11.

98. Janowsky, D. S. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. / Janowsky D.S., Davis J.M., El-Yousef M.K., Sekerke H.J. // *Lancet.* – 1972. – V. 300, № 7778. – P. 632–635.

99. Jasper, J. R. Ligand efficacy and potency at recombinant alpha2 adrenergic receptors: agonist-mediated (35S)GTPgammaS binding. / Jasper J.R., Lesnick J.D., Chang L.K., Yamanishi S.S., Chang T.K., Hsu S.A., Daunt D.A., Bonhaus D.W., Eglen R.M. // *Biochem. Pharmacol.* – 1998. – V. 55, № 7. – P. 1035–1043.

100. Jellish, W. S. The effect of clonidine on cell survival, glutamate, and aspartate release in normo- and hyperglycemic rats after near complete forebrain

ischemia. / Jellish W.S., Murdoch J., Kindel G., Zhang X., White F.A. // *Exp. Brain Res.* – 2005. – V. 167, № 4. – P. 526–534.

101. Jiang, L. The protective effects of dexmedetomidine on ischemic brain injury: A meta-analysis. / Jiang L., Hu M., Lu Y., Cao Y., Chang Y., Dai Z. // *J. Clin. Anest.* – 2017. № 40. – P. 25–32.

102. Jones, N. C. Experimental Traumatic Brain Injury Induces a Pervasive Hyperanxious Phenotype in Rats. / Jones N.C., Cardamone L., Williams J.P., Salzberg M.R., Myers D., O'Brien T.J. // *J. Neurotrauma.* – 2008. – V. 25, № 11. – P. 1367–1374.

103. Jope, R. S. Dimethylaminoethanol (deanol) metabolism in rat brain and its effect on acetylcholine synthesis. / Jope R.S., Jenden D.J. // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1979. – V. 211, № 3. – P. 472–479.

104. Jope, R. S. Choline and phospholipid metabolism and the synthesis of acetylcholine in rat brain. / Jope R.S., Jenden D.J. // *J. Neurosci. Res.* – 1979. – V. 4, № 1. – P. 69–82.

105. Jordan, L. M. Initiation of locomotion in mammals. / Jordan L.M. // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1998. – V. 860. – P. 83–93.

106. Jordan, L. M. Cholinergic mechanisms in spinal locomotion – potential target for rehabilitation approaches. / Jordan L.M., McVagh J.R., Noga B.R., Cabaj A.M., Majczyński H., Sławińska U., Provencher J., Leblond H., Rossignol S. // *Front. Neural Circuits.* – 2014. – V. 8.

107. Jordan, L. M. Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. / Jordan L.M., Liu J., Hedlund P.B., Akay T., Pearson K.G. // *Brain Research Reviews.* – 2008. – V. 57, № 1. – P. 183–191.

108. Juengst, S. B. A narrative literature review of depression following traumatic brain injury: Prevalence, impact, and management challenges. / Juengst S.B., Kumar R.G., Wagner A.K. // *Psychology Research and Behavior Management.* – 2017. – V. 10. – P. 175–186.

109. Kable, J. W. In vivo gene modification elucidates subtype-specific

functions of alpha-2-adrenergic receptors. / Kable J.W., Murin L.C., Bylund D.B. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2000. – V. 293, № 1. – P. 1–7.

110. Kalueff, A. V. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. / Kalueff A. V., Stewart A.M., Gerlai R. // *Trends in Pharmacological Sciences.* – 2014. – V. 35, № 2. – P. 63–75.

111. Kamibayashi, T. Clinical uses of  $\alpha$ 2-adrenergic agonists. / Kamibayashi T., Maze M. // *Anesthesiology.* – 2000. – V. 93, № 5. – P. 1345–1349.

112. Kanfer, J. N. Regulation of the choline, ethanolamine and serine base exchange enzyme activities of rat brain microsomes by phosphorylation and dephosphorylation. / Kanfer J.N., McCartney D., Hattori H. // *FEBS Lett.* – 1988. – V. 240, № 1–2. – P. 101–104.

113. Kaslin, J. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). / Kaslin J., Panula P. // *J Comp Neurol.* – 2001. – V. 440, № 4. – P. 342–377.

114. Kelton, M C. The effects of nicotine on Parkinson's disease. / Kelton M.C., Kahn H.J., Conrath C.L., Newhouse P.A. // *Brain Cogn.* – 2000. – V. 43, № 1–3. – P. 274–282.

115. Kempuraj, D. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. / Kempuraj D., Thangavel R., Natteru P., Selvakumar G., Saeed D., Zahoor H., Zaheer S., Iyer S., Zaheer A. // *J Neurol Neurosurg Spine.* – 2016. – V. 1, № 1. – P. 1–15.

116. Kewitz, H. Synthesis of choline from ethanolamine in rat brain / Kewitz H., Pleul O. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1976. – Vol.73, №7. – P. 2181–2185.

117. Khateb, A. Cognition-enhancing effects of donepezil in traumatic brain injury / Khateb A., Ammann J., Annoni J.M., Diserens K. // *Eur. Neurol.* – 2005 – Vol.54, №1. – P. 39–45.

118. Kiehn, O. Plateau properties in mammalian spinal interneurons during

transmitter-induced locomotor activity. / Kiehn O., Johnson B.R., Raastad M. // *Neuroscience*. – 1996. – V. 75, № 1. – P. 263–273.

119. Kilgard, M. P. Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. / Kilgard M.P., Merzenich M.M. // *Science* (80-. ). – 1998. – V. 279, № 5357. – P. 1714–1718.

120. King, R. B. Delayed onset of hemidystonia and hemiballismus following head injury: a clinicopathological correlation. Case report. / King R.B., Fuller C., Collins G.H. // *J Neurosurg*. – 2001. – V. 94, № 2. – P. 309–314.

121. Kita, T. Nicotine-induced sensitization to ambulatory stimulant effect produced by daily administration into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens in rats. / Kita T., Okamoto M., Nakashima T. // *Life Sci*. – 1992. – V. 50, № 8. – P. 583–590.

122. Kitagawa, K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. / Kitagawa K. // *FEBS Journal*. – 2007. – V. 274, № 13. – P. 3210–3217.

123. Kochenborger, L. Modulation of fear/anxiety responses, but not food intake, following  $\alpha$ -adrenoceptor agonist microinjections in the nucleus accumbens shell of free-feeding rats. / Kochenborger L., Zanatta D., Berretta L.M., Lopes A.P., Wunderlich B.L., Januário A.C., Neto J.M., Terenz M.G., Paschoalini M.A., Faria M.S. // *Neuropharmacology*. – 2012. – V. 62, № 1. – P. 427–435.

124. Korfiatis, S. Serum S-100B protein as a biochemical marker of brain injury: a review of current concepts. / Korfiatis S., Stranjalis G., Papadimitriou a, Psachoulia C., Daskalakis G., Antsaklis a, Sakas D.E. // *Curr. Med. Chem*. – 2006. – V. 13, № 30. – P. 3719–3731.

125. Kostopoulos, G. K. The effects of dimethylaminoethanol (deanol) on cerebral cortical neurons. / Kostopoulos G.K., Phillis J.W. // *Psychopharmacol. Commun*. – 1975. – V. 1, № 3. – P. 339–347.

126. Krauss, J. K. Dystonia following head trauma: a report of nine patients and review of the literature. / Krauss J.K., Mohadjer M., Braus D.F., Wakhloo

A.K., Nobbe F., Mundinger F. // *Mov Disord.* – 1992. – V. 7, № 3. – P. 263–272.

127. Krauss, J. K. Lesion of dentatothalamic pathways in severe post-traumatic tremor. / Krauss J.K., Wakhloo A.K., Nobbe F., Trankle R., Mundinger F., Seeger W. // *Neurol Res.* – 1995. – V. 17, № 6. – P. 409–416.

128. Krauss, J. K. The treatment of posttraumatic tremor by stereotactic surgery. Symptomatic and functional outcome in a series of 35 patients. / Krauss J.K., Mohadjer M., Nobbe F., Mundinger F. // *J. Neurosurg.* – 1994. – V. 80, № 5. – P. 810–819.

129. Krauss, J. K. Head injury and posttraumatic movement disorders. / Krauss J.K., Jankovic J., Starr P., Ostertag C., Lozano A.M., Grossman R.G. // *Neurosurgery.* – 2002. – V. 50, № 5. – P. 927–940.

130. Krauss, J. K. Posttraumatic movement disorders after moderate or mild head injury. / Krauss J.K., Tränkle R., Kopp K.H. // *Mov. Disord.* – 1997. – V. 12, № 3. – P. 428–431.

131. Krauss, J. K. Post-traumatic movement disorders in survivors of severe head injury. / Krauss J.K., Tränkle R., Kopp K.H. // *Neurology.* – 1996. – V. 47, № 6. – P. 1488–1492.

132. Kremer, M. A mid-brain syndrome following head injury. / Kremer M., Russell W.R., Smyth G.E. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 1947. – V. 10, № 2. – P. 49–60.

133. Kumar, R. G. Acute CSF interleukin-6 trajectories after TBI: Associations with neuroinflammation, polytrauma, and outcome. / Kumar R.G., Diamond M.L., Boles J.A., Berger R.P., Tisherman S.A., Kochanek P.M., Wagner A.K. // *Brain. Behav. Immun.* – 2015. – V. 45. – P. 253–262.

134. Laemmli, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / Laemmli U.K. // *Nature.* – 1970. – V. 227, № 5259. – P. 680–685.

135. Lee, T. T. Neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor following spinal cord contusion injury in the rat. / Lee T.T., Green B.A., Dietrich



W.D., Yeziarski R.P. // *J. Neurotrauma*. – 1999. – V. 16, № 5. – P. 347–356.

136. Leonard, M. G. Centhaquin attenuates hyperalgesia and non-evoked guarding in a rat model of postoperative pain primarily through  $\alpha 2B$ -adrenoceptors. / Leonard M.G., Jung S., Andurkar S. V., Gulati A. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2016.

137. Leuner, K. Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. / Leuner K., Kazanski V., Müller M., Essin K., Henke B., Gollasch M., Harteneck C., Müller W.E. // *FASEB J.* – 2007.

138. Levey, A. I. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. / Levey A.I. // *Life Sci.* – 1993. – V. 52, № 5–6. – P. 441–448.

139. Li, Y. Characterization of the neuroprotective and toxic effects of alpha7 nicotinic receptor activation in PC12 cells. / Li Y., Papke R.L., He Y.J., Millard W.J., Meyer E.M. // *Brain Res.* – 1999. – V. 830, № 2. – P. 218–225.

140. Lichtensteiger, W. Stimulation of nigrostriatal dopamine neurones by nicotine. / Lichtensteiger W., Hefti F., Felix D., Huwyler T., Melamed E., Schlumpf M. // *Neuropharmacology*. – 1982. – V. 21, № 10. – P. 963–968.

141. Lin, Y. Hyperforin attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats via inhibition of TRPC6 channels degradation. / Lin Y., Zhang J.C., Fu J., Chen F., Wang J., Wu Z.L., Yuan S.Y. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2013.

142. Lin, Y. Neuroprotective effect of resveratrol on ischemia/reperfusion injury in rats through TRPC6/CREB pathways. / Lin Y., Chen F., Zhang J., Wang T., Wei X., Wu J., Feng Y., Dai Z., Wu Q. // *J. Mol. Neurosci.* – 2013. – V. 50, № 3. – P. 504–513.

143. Lindenfeld, G. Chronic Fatigue Syndrome/Post Traumatic Stress Disorder: Are They Related? / Lindenfeld G., Rozelle G., Billiot K. // *J Psychol Clin Psychiatry*. – 2017. – V. 7, № 2.

144. Loane, D. J. Neuroprotection for traumatic brain injury: Translational

challenges and emerging therapeutic strategies. / Loane D.J., Faden A.I. // Trends in Pharmacological Sciences. – 2010– V. 31, № 12. – P. 596–604.

145. Loke, W. H. Effects of caffeine on mood and memory. / Loke W.H. // Physiol. Behav. – 1988. – V. 44, № 3. – P. 367–372.

146. Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. / Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J Biol Chem. – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265–275.

147. Lucas, S.-M. The role of inflammation in CNS injury and disease. / Lucas S.-M., Rothwell N.J., Gibson R.M. // Br. J. Pharmacol. – 2006. – V. 147, № S1. – P. S232–S240.

148. Luong, T. N. Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. / Luong T.N., Carlisle H.J., Southwell A., Patterson P.H. // J. Vis. Exp. – 2011 – V. 10, № 49. – P. 2376.

149. Lyeth, B. G. Group I metabotropic glutamate antagonist reduces acute neuronal degeneration and behavioral deficits after traumatic brain injury in rats. / Lyeth B.G., Gong Q.Z., Shields S., Muizelaar J.P., Berman R.F. // Exp Neurol. – 2001. – V. 169, № 1. – P. 191–199.

150. Ma, P. M. Catecholaminergic systems in the zebrafish. II. Projection pathways and pattern of termination of the locus coeruleus. / Ma P.M. // J Comp Neurol. – 1994. – V. 344, № 2. – P. 256–269.

151. MacMillan, L. B. Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype. / MacMillan L.B., Hein L., Smith M.S., Piascik M.T., Limbird L.E. // Science. – 1996. – V. 273, № 5276. – P. 801–803.

152. Magnoni, S. Lack of improvement in cerebral metabolism after hyperoxia in severe head injury: a microdialysis study. / Magnoni S., Ghisoni L., Locatelli M., Caimi M., Colombo A., Valeriani V., Stocchetti N. // J. Neurosurg. – 2003. – V. 98, № 5. – P. 952–958.

153. Makaritsis, K. P. Role of the alpha2B-adrenergic receptor in the development of salt- induced hypertension. / Makaritsis K.P., Handy D.E., Johns

C., Kobilka B., Gavras I., Gavras H. // *Hypertension*. – 1999. – V. 33, № 1. – P. 14–17.

154. Marin, P. Nicotine protects cultured striatal neurones against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. / Marin P., Maus M., Desagher S., Glowinski J., Prémont J. // *Neuroreport*. – 1994. – V. 5, № 15. – P. 1977–1980.

155. Menzel, M. Cerebral oxygenation in patients after severe head injury: monitoring and effects of arterial hyperoxia on cerebral blood flow, metabolism and intracranial pressure. / Menzel M., Doppenberg E.M., Zauner A., Soukup J., Reinert M.M., Clausen T., Brockenbrough P.B., Bullock R. // *J. Neurosurg. Anesthesiol.* – 1999. – V. 11, № 4. – P. 240–251.

156. Meythaler, J. M. Prospective assessment of tizanidine for spasticity due to acquired brain injury. / Meythaler J.M., Guin-Renfroe S., Johnson A., Brunner R.M. // *Arch Phys Med Rehabil.* – 2001. – V. 82, № 9. – P. 1155–1163.

157. Mihailescu, S. Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. / Mihailescu S., Palomero-Rivero M., Meade-Huerta P., Maza-Flores a, Drucker-Colín R. // *Eur. J. Pharmacol.* – 1998. – V. 360, № 1. – P. 31–36.

158. Miles, G. B. Neuromodulation of Vertebrate Locomotor Control Networks. / Miles G.B., Sillar K.T. // *Physiology*. – 2011. – V. 26, № 6. – P. 393–411.

159. Miles, G. B. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. / Miles G.B., Hartley R., Todd A.J., Brownstone R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – V. 104, № 7. – P. 2448–2453.

160. Millan, M. The neurobiology and control of anxious states. / Millan M. // *Prog. Neurobiol.* – 2003. – V. 70. – P. 83–244.

161. Milman, A. Mild traumatic brain injury induces persistent cognitive deficits and behavioral disturbances in mice. / Milman A., Rosenberg A., Weizman R., Pick C.G. // *J. Neurotrauma*. – 2005. – V. 22, № 9. – P. 1003–1010.

162. Miyakawa, T. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. / Miyakawa T., Yamada M., Duttaroy a, Wess J. // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21, № 14. – P. 5239–5250.

163. Moffett, J. R. N-Acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology. / Moffett J.R., Ross B., Arun P., Madhavarao C.N., Namboodiri A.M.A. // *Progress in Neurobiology.* – 2007. – V. 81, № 2. – P. 89–131.

164. Montoya, C. P. The «staircase test»: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. / Montoya C.P., Campbell-Hope L.J., Pemberton K.D., Dunnett S.B. // *J Neurosci Methods.* – 1991. – V. 36, № 2. – P. 219–228.

165. Moreno Moreno, M. D. J. Cognitive improvement in mild to moderate Alzheimer's dementia after treatment with the acetylcholine precursor choline alfoscerate: A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. / Moreno Moreno M.D.J. // *Clin. Ther.* – 2003. – V. 25, № 1. – P. 178–193.

166. Morton, C. C. A mechanism for suppression of the CDP-choline pathway during apoptosis. / Morton C.C., Aitchison A.J., Gehrig K., Ridgway N.D. // *J. Lipid Res.* – 2013. – V. 54. – P. 3373–3384.

167. Musienko, P. Controlling Specific Locomotor Behaviors through Multidimensional Monoaminergic Modulation of Spinal Circuitries. / Musienko P., van den Brand R., Marzendorfer O., Roy R.R., Gerasimenko Y., Edgerton V.R., Courtine G. // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31, № 25. – P. 9264–9278.

168. Myslinski, N. R. Responses of identified spinal neurones to acetylcholine applied by microelectrophoresis. / Myslinski N.R., Randić M. // *J. Physiol.* – 1977. – V. 269, № 1. – P. 195–219.

169. Nacif-Coelho, C. Perturbation of ion channel conductance alters the hypnotic response to the  $\alpha_2$ -adrenergic agonist dexmedetomidine in the locus coeruleus of the rat. / Nacif-Coelho C., Correa-Sales C., Chang L.L., Maze M. // *Anesthesiology.* – 1994. – № 81. – P. 1527–1534.

170. Neuwelt, E. Strategies to advance translational research into brain barriers. / Neuwelt E., Abbott N.J., Abrey L., Banks W.A., Blakley B., Davis T., Engelhardt B., Grammas P., Nedergaard M., Nutt J., Pardridge W., Rosenberg G.A., Smith Q., Drewes L.R. // *The Lancet Neurology*. – 2008. – V. 7, № 1. – P. 84–96.

171. Nguyen, M. A review of the use of clonidine as a sleep aid in the child and adolescent population. / Nguyen M., Tharani S., Rahmani M., Shapiro M. // *Clinical Pediatrics*. – 2014. – V. 53, № 3. – P. 211–216.

172. Nirogi, R. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. / Nirogi R., Kandikere V., Mudigonda K., Bhyrapuneni G., Muddana N., Saralaya R., Benade V. // *J. Neurosci. Methods*. – 2009. – V. 178, № 1. – P. 116–119.

173. Noga, B. R. Locomotor-activated neurons of the cat. II. Noradrenergic innervation and colocalization with NEalpha 1a or NEalpha 2b receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. / Noga B.R., Johnson D.M., Riesgo M.I., Pinzon A. // *J Neurophysiol*. – 2011. – V. 105, № 4. – P. 1835–1849.

174. Nudo, R. J. Recovery after brain injury: mechanisms and principles. / Nudo R.J. // *Front. Hum. Neurosci*. – 2013. – V. 7 – P. 887.

175. O'Neill, M. J. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. / O'Neill M.J., Murray T.K., Lakics V., Visanji N.P., Duty S. // *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. – 2002. – V. 1, № 4. – P. 399–411.

176. Okovityi, S. V. Succinate Receptors (SUCNR1) as a Potential Target for Pharmacotherapy. / Okovityi S. V., Rad'ko S. V., Shustov E.B. // *Pharm. Chem. J*. – 2015. – V. 49, № 9. – P. 573–577.

177. Panula, P. Modulatory Neurotransmitter Systems and Behavior: Towards Zebrafish Models of Neurodegenerative Diseases. / Panula P., Sallinen V., Sundvik M., Kolehmainen J., Torkko V., Tiittula A., Moshnyakov M., Podlasz

P. // Zebrafish. – 2006. – V. 3, № 2. – P. 235–247.

178. Paterson, D. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. / Paterson D., Nordberg A. // Progress in Neurobiology. – 2000. – V. 61, № 1. – P. 75–111.

179. Paxinos, G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. / Paxinos G., Watson C. 6th изд. Academic Press, – 2007. – 456 p.

180. Perrier, J. F.. Facilitation of plateau potentials in turtle motoneurons by a pathway dependent on calcium and calmodulin. / Perrier J.F., Mejia-Gervacio S., Hounsgaard J. // J. Physiol. – 2000. – V. 528, № 1. – P. 107–113.

181. Pomeroy, A. R. Cholinomimetic activity of dimethylamino-ethanol, and -propanol and related compounds. / Pomeroy A.R., Raper C. // Eur. J. Pharmacol. – 1972. – V. 17, № 1. – P. 81–86.

182. Potts, M. B. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. / Potts M.B., Koh S.-E., Whetstone W.D., Walker B.A., Yoneyama T., Claus C.P., Manvelyan H.M., Noble-Haeusslein L.J. // NeuroRx. – 2006. – V. 3, № 2. – P. 143–153.

183. Prasad, C. Chronic nicotine intake decelerates aging of nigrostriatal dopaminergic neurons. / Prasad C., Hiromasa Ikegami, Ikuya Shimizu, Onaivi E.S. // Life Sci. – 1994. – V. 54, № 16. – P. 1169–1184.

184. Quinlan, K. A. Cholinergic Modulation of the Locomotor Network in the Lamprey Spinal Cord. / Quinlan K.A. // J. Neurophysiol. – 2004. – V. 92, № 3. – P. 1536–1548.

185. Rabchevsky, A G. Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances tissue sparing and functional recovery following moderate spinal cord injury. / Rabchevsky A.G., Fugaccia I., Fletcher-Turner A., Blades D.A., Mattson M.P., Scheff S.W. // J. Neurotrauma. – 1999. – V. 16, № 9. – P. 817–830.

186. Remy, P. Peduncular «rubral» tremor and dopaminergic denervation: a PET study. / Remy P., de Recondo a, Defer G., Loc'h C., Amarenco P., Planté-

Bordeneuve V., Dao-Castellana M.H., Bendriem B., Crouzel C., Clanet M. // *Neurology*. – 1995. – V. 45, № 3 Pt 1. – P. 472–477.

187. Robertson, C. L. Increased adenosine in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children: Association with severity of injury and excitotoxicity. / Robertson C.L., Bell M.J., Kochanek P.M., Adelson P.D., Ruppel R.A., Carcillo J.A., Wisniewski S.R., Mi Z., Janesko K.L., Clark R.S.B., Marion D.W., Graham S.H., Jackson E.K. // *Crit. Care Med.* – 2001. – V. 29, № 12. – P. 2287.

188. Roof, R L. Estrogen-related gender difference in survival rate and cortical blood flow after impact-acceleration head injury in rats. / Roof R.L., Hall E.D. // *J Neurotrauma*. – 2000. – V. 17, № 12. – P. 1155–1169.

189. Rosell, A. Factors Secreted by Endothelial Progenitor Cells Enhance Neurorepair Responses after Cerebral Ischemia in Mice. / Rosell A., Morancho A., Navarro-Sobrino M., Martínez-Saez E., Hernández-Guillamon M., Lope-Piedrafita S., Barceló V., Borrás F., Penalba A., García-Bonilla L., Montaner J. // *PLoS One*. – 2013. – V. 8, № 9.

190. Rosin, D. L. Distribution of alpha 2C-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. / Rosin D.L., Talley E.M., Lee a, Stornetta R.L., Gaylinn B.D., Guyenet P.G., Lynch K.R. // *J. Comp. Neurol.* – 1996. – V. 372, №1. – P. 135–165.

191. Rossignol, S. Locomotion and its Recovery after Spinal Injury in Animal Models. / Rossignol S. // *Neurorehabil. Neural Repair*. – 2002. – V. 16, № 2. – P. 201–206.

192. Rossignol, S. Recovery of Locomotion After Spinal Cord Injury: Some Facts and Mechanisms. / Rossignol S., Frigon A. // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2011. – V. 34, № 1. – P. 413–440.

193. Roudet, C. Normal distribution of alpha 2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. / Roudet C., Mouchet P., Feuerstein C., Savasta M. // *J*

Neurosci Res. – 1994. – V. 39, № 3. – P. 319–329.

194. Ruuskanen, J. Identification of Duplicated Fourth  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptor Subtype by Cloning and Mapping of Five Receptor Genes in Zebrafish. / Ruuskanen J., Xhaard H., Marjamäki A., Salaneck E., Salminen T., Yan Y., Postlethwait J., Johnson M., Larhammar D., Scheinin M. // Mol. Biol. Evol. – 2004. – V. 21, № 1. – P. 14–28.

195. Ruuskanen, J. O. Conserved structural, pharmacological and functional properties among the three human and five zebrafish  $\alpha$ 2-adrenoceptors. / Ruuskanen J.O., Laurila J., Xhaard H., Rantanen V.V., Vuoriluoto K., Wurster S., Marjamäki A., Vainio M., Johnson M.S., Scheinin M. // Br. J. Pharmacol. – 2005. – V. 144, № 2. – P. 165–177.

196. Ruuskanen, J. O. Expression and function of  $\alpha$ 2-adrenoceptors in zebrafish: Drug effects, mRNA and receptor distributions. / Ruuskanen J.O., Peitsaro N., Kaslin J.V.M., Panula P., Scheinin M. // J. Neurochem. – 2005. – V. 94, № 6. – P. 1559–1569.

197. Sallinen, J. Genetic alteration of the alpha2-adrenoceptor subtype c in mice affects the development of behavioral despair and stress-induced increases in plasma corticosterone levels. / Sallinen J., Haapalinna A., MacDonald E., Viitamaa T., Lähdesmäki J., Rybnikova E., Peltto-Huikko M., Kobilka B.K., Scheinin M. // Mol Psychiatry. – 1999. – V. 4, № 5. – P. 443–452.

198. Sallinen, J. Genetic Alteration of  $\alpha$ 2C-Adrenoceptor Expression in Mice: Influence on Locomotor, Hypothermic, and Neurochemical Effects of Dexmedetomidine, a Subtype-Nonselective  $\alpha$ 2-Adrenoceptor Agonist. / Sallinen J., Link R.E., Haapalinna A., Viitamaa T., Kulatunga M., Sjöholm B., Macdonald E., Peltto-Huikko M., Leino T., Barsh G.S., Kobilka B.K., Scheinin M. // Mol. Pharmacol. – 1997. – V. 51, № 1. – P. 36–46.

199. Samie, M.R. Post-traumatic midbrain tremors. / Samie M.R., Selhorst J.B., Koller W.C. // Neurology. – 1990. – V. 40, № 1. – P. 62–66.

200. Sanders, R D. Alpha2-adrenoceptor agonists. / Sanders R.D., Maze M.



// *Curr Opin Investig Drugs*. – 2007. – V. 8, № 1. – P. 25–33.

201. Scanziani, M. Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission mediated by alpha adrenergic receptors in area CA3 of the rat hippocampus in vitro. / Scanziani M., Gähwiler B.H., Thompson S.M. // *J. Neurosci*. – 1993. – V. 13, № 12. – P. 5393–5401.

202. Schallert, Timothy. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. / Schallert T., Fleming S.M., Leasure J.L., Tillerson J.L., Bland S.T. // *Neuropharmacology*. – 2000 – V. 39, № 5. – P. 777–787.

203. Scherbel, U. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. / Scherbel U., Raghupathi R., Nakamura M., Saatman K.E., Trojanowski J.Q., Neugebauer E., Marino M.W., McIntosh T.K. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1999. – V. 96, № 15. – P. 8721–8726.

204. Schwarzbald, M. Psychiatric disorders and traumatic brain injury. / Schwarzbald M., Diaz A., Martins E.T., Rufino A., Amante L.N., Thais M.E., Quevedo J., Hohl A., Linhares M.N., Walz R. // *Neuropsychiatr Dis Treat*. – 2008. – V. 4, № 4. – P. 797–816.

205. Shao, C. Oxidative stress in head trauma in aging. / Shao C., Roberts K.N., Markesbery W.R., Scheff S.W., Lovell M.A. // *Free Radic. Biol. Med*. – 2006. – V. 41, № 1. – P. 77–85.

206. Sharples, C. G. V. Neuronal nicotinic receptors. / Sharples C.G. V, Wonnacott S. // *Prog. Neurobiol*. – 2000. – V. 19, № 1. – P. 363–396.

207. Shi, T J. Distribution of alpha2-adrenoceptor mRNAs in the rat lumbar spinal cord in normal and axotomized rats. / Shi T.J., Winzer-Serhan U., Leslie F., Hökfelt T. // *Neuroreport*. – 1999. – V. 10, № 13. – P. 2835–2839.

208. Shimohama, S. Nicotine-induced Protection Against Glutamate Cytotoxicity. / Shimohama S., Akaike A., Kimura J. // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. –

1996. – V. 777, № 1. – P. 356–361.

209. Silva, R. H. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice. / Silva R.H., Kameda S.R., Carvalho R.C., Takatsu-Coleman A.L., Niigaki S.T., Abílio V.C., Tufik S., Frussa-Filho R. // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2004. – V. 176, № 2. – P. 115–122.

210. Silverman, J.a. Decerebrate mammalian preparations: Unalleviated or fully alleviated pain? A review and opinion. / Silverman J., Garnett N.L., Giszter S.F., Heckman II C.J., Kulpa-Eddy J.A., Lemay M.A., Perry C.K., Pinter M. // *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* – 2005. – V. 44, № 4. – P. 34–36.

211. Smith, A. Effects of caffeine on human behavior. / Smith A. // *Food Chem. Toxicol.* – 2002. – V. 40, № 9. – P. 1243–1255.

212. Smith, J. C. In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. / Smith J.C., Feldman J.L. // *J. Neurosci. Methods.* – 1987. – V. 21, № 2–4. – P. 321–333.

213. Smith, M.S.  $\alpha$ 2-Adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding  $\alpha$ 2-adrenergic receptor subtypes at four distinct levels. /Smith M.S., Schambra U.B., Wilson K.H., Page S.O., Hulette C., Light A.R., Schwinn D.A. // *Mol. Brain Res.* – 1995– V. 34, № 1. – P. 109–117.

214. Söderpalm, B. Biphasic effects of clonidine on conflict behavior: involvement of different alpha-adrenoceptors. / Söderpalm B., Engel J.A. // *Pharmacol Biochem Behav.* – 1988. – V. 30, № 2. – P. 471–477.

215. Sriram, K. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. / Sriram K., O'Callaghan J.P. // *J. Neuroimmune Pharmacol.* – 2007. – V. 2, № 2. – P. 140–153.

216. Stewart, A. M.. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. / Stewart A.M., Braubach O., Spitsbergen J., Gerlai R., Kalueff A. V. // *Trends in Neurosciences.* – 2014. – V. 37, № 5. – P. 264–278.

217. Stibick, D L. Enduring vulnerability to transient reinstatement of

hemiplegia by prazosin after traumatic brain injury. / Stibick D.L., Feeney D.M. // *J Neurotrauma*. – 2001. – V. 18, № 3. – P. 303–12.

218. Strawn, J. R. Extended Release Guanfacine in Pediatric Anxiety Disorders: A Pilot, Randomized, Placebo-Controlled Trial. / Strawn J.R., Compton S.N., Robertson B., Albano A.M., Hamdani M., Rynn M.A. // *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* – 2017. – V. 27, № 1. – P. 29–37.

219. Sudo, R.T. Antinociception induced by a novel alpha 2A adrenergic receptor agonist in rodents acute and chronic pain models. / Sudo R.T., do Amaral R.V., Monteiro C.E.D.S., Pitta I.D.R., Lima M.D.C., Montes G.C., Ririe D.G., Hayashida K., Zapata-Sudo G. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2017– №. 815. – P. 210-218.

220. Talke, P. Effects of dexmedetomidine on hypoxia-evoked glutamate release and glutamate receptor activity in hippocampal slices. / Talke P., Bickler P.E. // *Anesthesiology*. – 1996. – V. 85, № 3. – P. 551–557

221. Tavazzi, B. Cerebral oxidative stress and depression of energy metabolism correlate with severity of diffuse brain injury in rats. / Tavazzi B., Signoretti S., Lazzarino G., Amorini A.M., Delfini R., Cimatti M., Marmarou A., Vagnozzi R. // *Neurosurgery*. – 2005. – V. 56, № 3. – P. 582–588.

222. Tenovuo, O. S. Cholinergic Treatment of Traumatic Brain Injury. / Tenovuo O.S. // *Curr. Drug ther.* – 2006– V. 19, № 6. – P. 528–533.

223. Tillakaratne, N. J. K. Identification of interneurons activated at different inclines during treadmill locomotion in adult rats. / Tillakaratne N.J.K., Duru P., Fujino H., Zhong H., Xiao M.S., Edgerton V.R., Roy R.R. // *J. Neurosci. Res.* – 2014. – V. 92, № 12. – P. 1714–1722.

224. Trankle, R. Post-traumatic focal dystonia after contralateral thalamic lesion. / Trankle R., Krauss J.K. // *Nervenarzt*. – 1997. – V. 68, № 6. – P. 521–524.

225. Turkstra, Lyn S. Cognitive-communication disorders in children with traumatic brain injury. / Turkstra L.S., Politis A.M., Forsyth R. // *Developmental Medicine and Child Neurology*. – 2015. – V. 57, № 3. – P. 217–222.

226. Tyrrell, P. J. Fatigue after stroke. / Tyrrell P.J., Smithard D. //

Therapy. – 2005. – V. 2, № 6. – P. 865–869.

227. Uzsoki, B. Novelty response of rats determines the effect of prefrontal alpha-2 adrenoceptor modulation on anxiety. / Uzsoki B., Tóth M., Hernádi I. // *Neurosci. Lett.* – 2011. – V. 499, № 3. – P. 219–223.

228. Vendruscolo, L F. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats. / Vendruscolo L.F., Izídio G.S., Takahashi R.N., Ramos A. // *Behav Pharmacol.* – 2008. – V. 19, № 1. – P. 21–27.

229. Verweij, B. H. Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. / Verweij B.H., Muizelaar J.P., Vinas F.C., Peterson P.L., Xiong Y., Lee C.P. // *J. Neurosurg.* – 2000. – V. 93. – P. 815–820.

230. Walf, A A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. / Walf A.A., Frye C.A. // *Nat Protoc.* – 2007. – V. 2, № 2. – P. 322–328.

231. Walf, A. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. / Walf A.A., Frye C.A. // *Nat. Protoc.* – 2007– V. 2, № 2. – P. 322–328.

232. Wang, R. Expression of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the mouse brain: evaluation of spatial and temporal information imparted by 3 kb of 5' regulatory sequence for the alpha 2A AR-receptor gene in transgenic animals. / Wang R., Macmillan L.B., Fremeau R.T., Magnuson M.A., Lindner J., Limbird L.E. // *Neuroscience.* – 1996. – V. 74, № 1. – P. 199–218.

233. Weiner, W. J. The effect of dimethylaminoethanol (deanol) on Amphetamine-induced Stereotyped Behavior (AISB). / Weiner W.J., Kanapa D.J., Klawans H.L. // *Life Sci.* – 1976. – V. 19, № 9. – P. 1371–1376.

234. Wen, R. Alpha 2-adrenergic agonists induce basic fibroblast growth factor expression in photoreceptors in vivo and ameliorate light damage. / Wen R., Cheng T., Li Y., Cao W., Steinberg R.H. // *J. Neurosci.* – 1996. – V. 16, № 19. – P. 5986–5992.

235. Werner, C. Pathophysiology of traumatic brain injury. / Werner C., Engelhard K. // *British Journal of Anaesthesia*. – 2007. – V. 99, № 1. – P. 4–9.

236. Wess, J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. / Wess J. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – V. 44. – P. 423–450.

237. Westerfield, M. *The Zebrafish Book. A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. / Westerfield M. 4th изд. University of Oregon Press Eugene, – 2000.

238. Wilson, J. M. Postnatal development of cholinergic synapses on mouse spinal motoneurons. / Wilson J.M., Rempel J., Brownstone R.M. // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – V. 474, № 1. – P. 13–23.

239. Woodcock, T. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. / Woodcock T., Morganti-Kossmann M.C. // *Front. Neurol.* – 2013. – №. 4– P. 18.

240. Wrenn, C. C. Effects of clonidine and methylphenidate on motor activity in *Fmr1* knockout mice. / Wrenn C.C., Heitzer A.M., Roth A.K., Nawrocki L., Valdovinos M.G. // *Neurosci. Lett.* – 2015. – V. 585. – P. 109–113.

241. Wu, H.-M. a c. Selective Metabolic Reduction in Gray Matter Acutely following Human Traumatic Brain Injury. / Wu H.-M., Huang S.-C., Hattori N., Glenn T.C., Vespa P.M., Yu C.-L., Hovda D.A., Phelps M.E., Bergsneider M. // *J. Neurotrauma*. – 2004. – V. 21, № 2. – P. 149–161.

242. Yanli, L. Clonidine preconditioning alleviated focal cerebral ischemic insult in rats via up-regulating p-NMDAR1 and down-regulating NMDAR2A / p-NMDAR2B. / Yanli L., Xizhou Z., Yan W., Bo Z., Yunhong Z., Zicheng L., Lingling Y., lingling Y., Zhangao C., Min Z., Zhi H. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2016. – V. 793. – P. 89–94.

243. Yoon, S. J. Neurochemical alterations in methamphetamine-dependent patients treated with cytidine-5'-diphosphate choline: A longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy study. / Yoon S.J., Lyoo I.K., Kim H.J., Kim

T.S., Sung Y.H., Kim N., Lukas S.E., Renshaw P.F. // *Neuropsychopharmacology*. – 2010. – V. 35, № 5. – P. 1165–1173.

244. Yu, C. Y. Therapeutic Antibodies in Stroke. /Yu C.Y., Ng G., Liao P. // *Translational Stroke Research*. – 2013. – P. 477–483.

245. Zaremba, J. (Cytokines in clinical and experimental ischemic stroke). / Zaremba J., Losy J. // *Neurol. Neurochir. Pol.* – 2004. – V. 38, № 1 Suppl 1. – P. S57-62.

246. Zhang, E. Brain transient receptor potential channels and stroke. / Zhang E., Liao P. // *Journal of Neuroscience Research*. – 2015 . – V. 93, № 8. – P. 1165–1183.

247. Zhang, H. Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment. / Zhang H., Sun S., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Fon Tacer K., Bezprozvanny I. // *J. Neurosci.* – 2016. – V. 36, № 47. – P. 11837–11850.

248. Zhang, Y. Clonidine preconditioning decreases infarct size and improves neurological outcome from transient forebrain ischemia in the rat. / Zhang Y. // *Neuroscience*. – 2004. – V. 125, № 3. – P. 625–631.

249. Zhao, Y. Z.. Intranasal delivery of bFGF with nanoliposomes enhances in vivo neuroprotection and neural injury recovery in a rodent stroke model. /Zhao Y.Z., Lin M., Lin Q., Yang W., Yu X.C., Tian F.R., Mao K.L., Yang J.J., Lu C.T., Wong H.L. // *J. Control. Release*. – 2016. – V. 224. – P. 165–175.

250. Zhao, Z. C. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. / Zhao Z.C., Li F., Maiese K., Chong Z.Z., Li F., Maiese K. // *Prog. Neurobiol.* – 2005. – V. 75, № 3. – P. 207–246.

251. Zilles, K. Regional and laminar distributions of alpha 1-adrenoceptors and their subtypes in human and rat hippocampus. / Zilles K., Gross G., Schleicher A., Schildgen S., Bauer A., Bahro M., Schwendemann G., Zech K., Kolassa N. // *Neuroscience*. – 1991. – V. 40, № 2. – P. 123–132.

252. Zygmunt, M. Muscle relaxants--the current position in the treatment of spasticity in orthopedics. / Zygmunt M., Sapa J. // Ortop. Traumatol. Rehabil. – 2015. – V. 17, № 4. – P. 423–430.