

На правах рукописи

Черных Иван Владимирович

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р В
ТЕРАПИИ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ**

3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Рязань – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Якушева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, заведующий лабораторией фармакокинетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр психического здоровья»

Мирошниченко Игорь Иванович

доктор биологических наук, профессор, старший преподаватель кафедры фармакологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Зарубина Ирина Викторовна

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук

Яснецов Виктор Владимирович

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 20__ г в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.183.01, созданного на базе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ученой части ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова») по адресу: 125315 Москва, ул. Балтийская, д. 8 и на сайте www.academpharm.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Вальдман Елена Артуровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Гликопротеин-Р (Pgp) – это мембранный белок-транспортер, удаляющий из клеток широкий спектр субстратов за счет энергии гидролиза аденозинтрифосфата. Локализуясь в слизистой оболочке тонкого кишечника, на билиарной мембране гепатоцитов, в эпителиоцитах канальцев нефронов, в гистогематических барьерах транспортер обеспечивает удаление из клеток потенциально опасных экзогенных веществ. Функциональная активность транспортера может различаться в зависимости от генетических особенностей организма, наличия патологических состояний, приема некоторых пищевых продуктов и лекарственных средств. Изменение функционирования транспортера способно привести к нежелательным лекарственным реакциям и межлекарственным взаимодействиям, т.к. к числу субстратов Pgp относится большое количество лекарственных препаратов, фармакокинетика которых зависит от его активности. Индукция Pgp может повлечь неэффективность фармакотерапии в связи с угнетением всасывания лекарственного вещества-субстрата в кишечнике и его ускоренной экскрецией, а также затруднением проникновения через гистогематические барьеры, а ингибирование – привести к относительной лекарственной передозировке (Кукес, В.Г. и др. М.: Гэотар-Медиа. 2008. 304 с).

Изменение функционирования Pgp может являться патогенетическим звеном некоторых патологических состояний и заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), таких как множественная лекарственная устойчивость опухолей мозга (Mollazadeh, S. et al. Life Sci. 2018. Vol. 214. P. 118–123), болезнь Альцгеймера, неэффективность нейропротекторного лечения последствий нарушений мозгового кровообращения (DeMars, K.M. et al. // J. Exp. Neurosci. 2017. Vol. 11. P. 1–9). Поэтому направленную фармакологическую регуляцию активности Pgp можно рассматривать в качестве терапевтической стратегии при лечении указанных патологий.

Цереброваскулярные заболевания являются второй по частоте причиной смерти после ишемической болезни сердца (Скворцова, В.И. и др. *Анн. неврол.* 2018. Т. 12 (3). С. 5–12). Среди них ишемические инсульты диагностируются в 65% случаев. Их терапия подразумевает реперфузию, эндоваскулярные хирургические методы, базисное лечение и нейропротекцию (Суслина, З.А., Пирадов, М.А., Домашенко, М.А. *Ж. неврол. психиатр. им. С.С. Корсакова.* 2014. (11). С. 5–13).

Локализация Pgp обнаружена в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), глиальных клетках и нейронах головного мозга, где транспортер обеспечивает избирательное проникновение в мозг лишь ряда низкомолекулярных веществ (Miller, D.S., Bauer, B., Hartz, A.M.S. *Pharmacol. rev.* 2008. Vol. 60 (2). P. 196–209).

В современной неврологии заболевания, основой патогенеза которых считается гипоксия, являются лидирующими (Дума, С.Н., Рагина, Ю.И. *Трудный пациент.* 2011. Т. 9(4). С. 28–36). В научной литературе имеется информация о влиянии гипоксии на активность Pgp. Большинство исследований *in vitro* показало повышение активности Pgp и экспрессии его гена на фоне гипоксической гипоксии (Wartenberg M. et al. *Int. J. Cancer.* 2005. Vol. 113(2). P. 229–240). Однако функционирование транспортера на фоне циркуляторной гипоксии на уровне целостного организма или локально в ГЭБ освещено слабо (Belayev, L., et al. *Brain Res.* 1996. Vol. 739(1–2). P. 88–96; Cen, J. et al. *J. Pharm. Pharmacol.* 2013. Vol.65. P. 665–672). Также недостаточно изучены механизмы регуляции Pgp на фоне данных патологий *in vivo*, в частности, роль таких транскрипционных факторов, как Nrf2 и HIF1, являющихся стимуляторами экспрессии гена *MDR1*, кодирующего данный белок-транспортер (Jin-Lian, H. et al. *Drug Des. Devel. Ther.* 2015. (9). P. 127–146; Badowska-Kozakiewicz, A.M., Sobol, M., Patera, J. *Arch. Med. Sci.* 2017. Vol. 13(6). P. 1303–1314.).

Таким образом, в связи с доказанной ролью Pgr в защите тканей мозга от потенциально токсичных веществ, а также его влиянием на эффективность и безопасность фармакотерапии особенности функционирования транспортера на фоне дефицита кислорода требуют дальнейшего более детального и комплексного изучения. Выявление механизмов регуляции Pgr позволит расширить спектр подходов к изменению его активности. Фармакологическое ингибирование Pgr может иметь терапевтическую ценность для стимуляции проникновения нейропротективных и вазоактивных лекарственных средств-субстратов Pgr через ГЭБ и повышения эффективности фармакотерапии глобальной или фокальной церебральной ишемии. Актуальным является анализ влияния различных церебральных ишемических патологий на функционирование Pgr в головном мозге. Оценка принадлежности нейропротекторных средств к субстратам и модуляторам Pgr позволит подобрать препарат для дальнейшего анализа целесообразности его совместного применения с веществом, снижающим функциональную активность транспортера локально в ГЭБ, на фоне ишемических повреждений головного мозга, сопровождающихся увеличением количества Pgr.

Цель исследования

Изучить функционирование Pgr на фоне глобальной и фокальной церебральной ишемии для анализа возможности и перспективы направленной фармакологической регуляции транспортера и повышения эффективности нейропротекторной терапии ишемических патологий.

Задачи исследования

1. Оценить абсолютное количество Pgr в ткани коры головного мозга и его зависимость от уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и количества транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 на фоне глобальной ишемии мозга крыс.

2. Оценить абсолютное количество Pgr в ткани коры головного мозга и его зависимость от уровня ПОЛ и количества транскрипционных факторов Nrf-1 и Nrf2 на фоне фокальной ишемии и ишемии-реперфузии мозга крыс.

3. Модифицировать и валидировать ВЭЖХ-методику количественного определения нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов.

4. Исследовать принадлежность нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к числу субстратов и модуляторов функционирования Pgr.

5. Оценить функциональную активность Pgr на уровне целостного организма кроликов на фоне глобальной ишемии мозга.

6. Изучить функциональную активность Pgr в ГЭБ в норме и на фоне индуктора и ингибитора транспортера.

7. Оценить целесообразность ингибирования Pgr в ГЭБ для повышения фармакологического эффекта нейропротектора-субстрата Pgr нимодипина на фоне глобальной ишемии мозга крыс.

8. Оценить целесообразность ингибирования Pgr в ГЭБ для повышения фармакологического эффекта нейропротектора-субстрата Pgr нимодипина на фоне фокальной ишемии мозга крыс.

9. Оценить функциональную активность Pgr в ГЭБ и проницаемость барьера на фоне фокальной ишемии мозга крыс.

Методология и методы исследования

При планировании экспериментальных исследований использовались методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств (Миронов А.Н. и др. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.).

Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола, а также односторонней окклюзии общей сонной артерии (ОСА) на функционирование Pgr оценивалось на кроликах-самцах породы Шиншилла по фармакокинетике маркерного субстрата транспортера – фексофенадина

после его однократного внутрижелудочного (в/ж) введения. Данная модель была валидирована с использованием классических ингибитора и индуктора транспортера (Гацанога, М.В. и др. Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2016. Т.4(4). С. 5–10).

Активность Pgp в ГЭБ анализировали по степени проникновения фексофенадина в кору головного мозга крыс. Концентрацию вещества в плазме крови и в гомогенате коры мозга оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием по оригинальным валидированным методикам. При анализе принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к субстратам Pgp также были модифицированы и валидированы ВЭЖХ-методики их количественного определения в плазме крови кроликов. Целостность ГЭБ оценивалась по степени накопления красителя Evans blue в ткани мозга. Для выявления механизма изменения активности Pgp иммуногистохимически оценивали относительное количество транспортера. Его абсолютное количество и уровень Nrf-1 и Nrf2 в головном мозге определяли гетерогенным иммуноферментным анализом (ГИФА). Активность ПОЛ определяли классическими биохимическими методами.

Полученные результаты подвергались адекватной статистической обработке. Исследование соответствует пунктам 4, 8 и 14 паспорта специальности «14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология».

Апробация результатов

Материалы исследования доложены и представлены на IX Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2015), на Одиннадцатом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2015), на VI Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиология кровообращения» (Москва, 2016), на Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2016), на II

Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова (Рязань, 2016), на Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2016), на 21-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2017), на XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), на 65 годичной международной научно-практической конференции Таджикского государственного медицинского университета имени Абуали ибни Сино «Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире» (Душанбе, 2017), на Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017), на Российской научной конференции, посвященной 125-летию академика С.В. Аничкова «Фармакология регуляторных нейропептидов» (Санкт-Петербург, 2017), на II Всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2017), на шестой конференции RUS-LASA (Рязань, 2017), на III Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2017), на XVII Всероссийском симпозиуме «Эколого-физиологические проблемы адаптации (Рязань, 2017), на Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2017), на 22-й Международной пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018), на V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018), на Международной конференции «Психофизиология и психоэндокринология» (Ставрополь, 2018), на XIV

международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018), на Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018), на Медицинском профессорском форуме «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении» (Ярославль, 2018), на XV международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2019). Исследование поддержано грантами Российского фонда фундаментальных исследований №14-04-97522 о_центр_а, №16-44-620292 р_а.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно подготовлен систематический обзор литературы по изучаемой проблеме, запланирован дизайн исследования, проведены эксперименты *in vivo*, хроматографический и ГИФА, обработка и интерпретация данных, оформление публикаций по диссертационной работе.

Положения, выносимые на защиту

1. Билатеральная окклюзия ОСА крыс (модель глобальной ишемии мозга) приводит к возрастанию абсолютного количества Pgr в коре головного мозга, начиная с 4-го и до 48-го ч ишемии, что коррелирует с уровнем окислительного стресса и количеством транскрипционного фактора Nrf2 в ткани коры головного мозга, а также сопровождается возрастанием количества кислородчувствительного транскрипционного фактора HIF-1.

2. 30- и 60-минутная окклюзия средней мозговой артерии (СМА) крыс с последующей реперфузией (модель фокальной ишемии мозга) приводит к возрастанию абсолютного количества Pgr в коре головного мозга через 24 ч после реканализации, что сопровождается увеличением уровня транскрипционного фактора Nrf2 в ткани коры головного мозга и развитием выраженного окислительного стресса. При использовании более продолжительной фокальной ишемии мозга (3 часа окклюзии СМА с суточной

реперфузией, 4,5 часа окклюзии без реперфузии и с реперфузией в течение 12 и 24 ч) наблюдается снижение абсолютного количества Pgr.

3. Модифицированы и валидированы ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов.

4. Этилметилгидроксипиридина сукцинат, омберацетам и фабомотизол не принадлежат к числу субстратов Pgr. Этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол ингибируют, а омберацетам не изменяет функциональную активность Pgr на уровне целостного организма.

5. Односторонняя окклюзия ОСА кроликов не приводит к изменению функциональной активности Pgr на уровне целостного организма.

6. Функциональная активность Pgr в ГЭБ коры головного мозга крыс повышается на фоне введения классического индуктора Pgr – рифампицина и снижается на фоне ингибитора Pgr – омепразола.

7. Введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата Pgr – нимодипина совместно с ингибитором транспортера – омепразолом повышает выживаемость и снижает уровень неврологического дефицита животных на фоне билатеральной окклюзии ОСА по сравнению с изолированным введением нимодипина.

8. Введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата Pgr – нимодипина совместно с ингибитором транспортера – омепразолом не уменьшает величину зоны некроза головного мозга, вызванного окклюзией-реперфузией СМА, по сравнению с изолированным введением нимодипина, что связано с нарушением проницаемости ГЭБ.

Научная новизна

Впервые показано, что абсолютное количество Pgr в коре головного мозга крыс повышается, начиная с 4-го часа после билатеральной окклюзии ОСА (модель глобальной ишемии мозга) и остается повышенным до 48 часов ишемии, что коррелирует с интенсификацией перекисного окисления липидов

(ПОЛ) и количеством транскрипционного фактора Nrf2 в ткани коры головного мозга, а также сопровождается увеличением уровня транскрипционного фактора NIF-1.

Показано, что 30- и 60-минутная окклюзия СМА с последующей 24-часовой реперфузией (модель фокальной ишемии мозга) приводит к повышению абсолютного количества Pgr в головном мозге через 24 часа после реканализации, что сопровождается активацией ПОЛ и ростом количества транскрипционного фактора Nrf2 в коре головного мозга. 12-часовая реперфузия приводит к снижению количества транспортера при 4,5-часовой окклюзии, но при менее длительной окклюзии изменения его уровня не наблюдаются. Продление срока окклюзии СМА до 3 и 4,5 часов приводит к снижению количества Pgr при суточной реперфузии.

Модифицированы и валидированы три оригинальные ВЭЖХ-методики количественного определения препаратов с нейропротективной активностью: этилметилгидроксипиридина сукцинат, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов. Установлено, что фармакокинетика ни одного из них не зависит от функционирования Pgr, т.е. они не являются субстратами данного транспортера. Выявлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол при курсовом введении кроликам ингибируют функциональную активность Pgr, а фабомотизол также снижает его относительное количество на билиарной поверхности гепатоцитов.

На кроликах продемонстрировано, что односторонняя окклюзия ОСА не вызывает изменения активности Pgr на уровне целостного организма. Это свидетельствует о том, что анализ количества фексофенадина в головном мозге на фоне его ишемии может характеризовать изменение активности транспортера локально в ГЭБ.

Проведена оценка активности Pgr локально в ГЭБ крыс, определяемая по содержанию фексофенадина – маркерного субстрата транспортера в коре головного мозга, в норме. Показано повышение функциональной активности

транспортера в ГЭБ на фоне курсового введения животным классического индуктора Pgr – рифампицина и снижение на фоне ингибитора – омепразола.

Показано, что курсовое введение крысам комбинации нейропротективного средства-субстрата Pgr – нимодипина и ингибитора транспортера – омепразола на фоне двусторонней окклюзии ОСА (модели глобальной ишемии мозга) снижает смертность и уровень неврологического дефицита животных по сравнению с изолированным введением нимодипина. Однако данная комбинация на фоне окклюзии СМА с реперфузией не сокращает зону некроза мозга по сравнению с изолированным применением нейропротектора.

Неэффективность ингибирования Pgr в ГЭБ при фокальной ишемии мозга связана со снижением функциональной активности транспортера в барьере и нарушением его проницаемости.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате исследования показано повышение абсолютного количества Pgr в мозге на фоне глобальной церебральной ишемии. Эти данные создают предпосылки для корректировки доз лекарственных средств-субстратов транспортера в сторону увеличения при фармакотерапии заболеваний мозга, в патогенезе которых присутствует дефицит кислорода ткани.

Апробированные ВЭЖХ-методики количественного анализа этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола можно рекомендовать к использованию для исследования фармакокинетики указанных средств.

Установлена прямая зависимость функционирования Pgr от интенсивности ПОЛ. При этом количество Pgr на фоне глобальной и фокальной ишемии мозга коррелирует с уровнем транскрипционного фактора Nrf2. NIF-1 вовлечен в регуляцию функционирования Pgr преимущественно при глобальной церебральной ишемии.

Фармакокинетика этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола не зависит от функционирования Pgr, что свидетельствует о

возможности их безопасного применения в комбинации с модуляторами его активности. Выявлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол снижают функциональную активность Pgp на уровне целостного организма. Это позволяет применять указанные средства в качестве положительного контроля пониженной функциональной активности белка-транспортера при поиске веществ аналогичного действия в экспериментальных исследованиях. Подтверждение ингибирующего потенциала этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола по отношению к Pgp в клинических исследованиях позволит прогнозировать фармакокинетические взаимодействия с участием данных препаратов и веществ-субстратов транспортера.

Повышение выживаемости животных на фоне билатеральной окклюзии ОСА при комбинированном введении нимодипина (субстрата Pgp) и омепразола (ингибитора транспортера) по сравнению с изолированным использованием нимодипина показывает перспективность ингибирования активности транспортера в ГЭБ на фоне глобальной ишемии мозга. Недостоверное сокращение площади некроза при фокальной ишемии мозга при назначении комбинации нимодипина и омепразола свидетельствует о нецелесообразности ингибирования Pgp в ГЭБ для повышения эффективности терапии последствий фокальной ишемии мозга, что связано с нарушением структуры и повышением проницаемости барьера.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов и ординаторов на кафедре фармакологии с курсом фармации ФДПО, кафедре нормальной физиологии с курсом психофизиологии, кафедре патофизиологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, а также внедрены в практику ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертации опубликована 51 работа: 20 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 8 – в журналах из списка Web of Science и Scopus. Получено 2 патента РФ и оформлены 4 рационализаторских предложения ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 262 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 375 источников, из них отечественной – 117 и зарубежной – 258 источников, за последние 5 лет более 25%. Работа иллюстрирована 50 таблицами и 59 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнялась на половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, массой 3500–4300 г и половозрелых крысах-самцах вистар массой 250–360 г. Крысы были получены из питомника «Столбовая» Московской области, кролики – из питомника ООО «Касимов-Миагро» Рязанской области.

Экспериментальные исследования осуществлялись в соответствии с правилами лабораторной практики (Приложение к приказу Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 708н; Приказ МЗ РФ от 1.04.2016 №199н) и были одобрены комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, протокол №7 (от 03.04.2018). Оперативные вмешательства у крыс

проводились на фоне внутрибрюшинного введения препарата золетил 50 («Virbac», Франция) в дозе 10 мг/кг (Wang, H. et al. *Mol. med. rep.* 2016. Vol. 13(5). P. 4215–4220). Эвтаназия осуществлялась забором крови из брюшной аорты на фоне введения золетила (30 мг/кг). Оперативные вмешательства у кроликов проводили после наркотизации внутримышечным введением рометара (ксилазина гидрохлорид; 5,0 мг/кг) и золетила-50 (10 мг/кг) (Arapasevich, V. et al. *J. Funct. Biomater.* 2020. Vol. 11(4). P. 1–12).

Глобальная ишемия мозга моделировалась путем билатеральной окклюзии ОСА крыс. Фокальная ишемия мозга воспроизводилось путем эндоваскулярной окклюзии-реперфузии СМА по методу Koizumi (Koizumi, J. et al. *Jpn. J. Stroke.* 1986. Vol. 8. P. 1–8). Использовалась 30-, 60, 180- и 270-минутная окклюзия СМА без реперфузии, а также окклюзия аналогичной продолжительности с реперфузией в течение 12 и 24 ч.

Оценка абсолютного количества Pgr в коре головного мозга на фоне билатеральной окклюзии ОСА крыс, а также окклюзии и окклюзии-реперфузии СМА выполнялась методом гИФА. Исследование проведено с использованием диагностического набора ElisaKits BlueGene (КНР) в соответствии с инструкцией производителя.

Для выявления механизмов изменения количества Pgr на фоне церебральной ишемии с помощью гИФА было изучено абсолютное количество транскрипционных факторов-активаторов экспрессии гена, кодирующего Pgr, в гомогенате коры головного мозга крыс: Nrf2 – сенсора окислительного стресса (Jeddiabc, F. et al. *Biomed. and Pharmacother.* 2018. Vol. 97. P. 286–292), и HIF-1 – детектора тканевого дефицита кислорода (Comerford, K.M. et al. *Cancer Res.* 2002. Vol. 62. P. 3387). Использовались диагностические наборы ElisaKits Cloud-Clone (КНР) (Nrf2) и ElisaKits BlueGene (КНР) (субъединица HIF-1 α). Абсолютное количество Pgr и транскрипционных факторов соотносили с общим количеством белка, которое определяли по методу Бредфорд (Bradford, M.M. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72(1–2). P. 248–254).

Для оценки выраженности патологических изменений при оокклюзии и окклюзии-реперфузии СМА крыс проведено исследование интенсивности ПОЛ в гомогенате коры головного мозга. Анализировались концентрация малонового диальдегида (Стальная, И.Д. Современные методы в биохимии. М.: Б.И., 1977. С. 66–68), уровень общих сульфгидрильных групп (Ellman, G.L. Archives of biochemistry and biophysics. 1959. Vol. 82(1). P. 70–77) и активность глутатионпероксидазы (Ланкин, В.З., Гуревич, С.М, ДАН СССР. 1976. Т. 226 (3). С. 705–708).

Изучение принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола к числу субстратов P_{gr} выполнялось на 12 кроликах (две группы по 6 животных). Тестирование омберацетама проводилось на 6 кроликах по причине низких плазменных концентраций и невозможности применения индуктора транспортера. Исследование заключалось в анализе фармакокинетики тестируемого вещества у интактных животных, и после 14-дневного в/ж введения ингибитора (верапамил (Carrigos, M., Mir, L.M., Orłowski, S. Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 244 (2). P. 664–673) (таблетки, покрытые оболочкой, Верапамил, 80 мг, «Валента Фармацевтика» ОАО, Россия) (20 мг/кг 3 раза в день (Колхир, С.В. автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.25. М., 2007. 21 с.)) и индуктора (рифампицин (Kim, S.W. et al., J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290(27). P. 17029–17040) (капсулы Рифампицин, 150 мг, РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) (20 мг/кг массы 2 раза в день)) P_{gr}. Тестируемое вещество вводилось однократно в/ж, после чего у животных забиралась кровь из ушной краевой вены в различные временные точки, необходимые для расчета фармакокинетических параметров. Если изменение фармакокинетики тестируемого средства при введении ингибитора P_{gr} свидетельствовало о накоплении вещества в организме, а при введении индуктора наблюдалась обратная динамика, делался вывод о его принадлежности к субстратам P_{gr}.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (таблетки, покрытые пленочной оболочкой Мексидол, 125 мг, ООО НПК «Фармасофт», Россия) вводился в/ж

кроликам в дозе 100 мг/кг массы (Воронина, Т.А. и др. Эксперим. клин. фармакол. 2006. Т.69(4). С. 6–9), кровь забиралась через 15; 30 мин; 1; 1,5; 2; 3; 4 и 5 часов; омберацетам (таблетки Ноопепт, 10 мг, ЗАО «ЛЕККО», Россия) – в дозе 50 мг/кг массы (Бойко, С.С. и др., Хим.-фарм. журнал. 2004. Т. 38(12). С. 3–5) в/ж, кровь забиралась через 5, 10, 15, 30, 45, 60 и 90 мин; фабомотизол (таблетки Афобазол, 10 мг, ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия) – в дозе 3,8 мг/кг массы (Хабриев, Р.У. М.: Медицина, 2005. С. 48–51; Середенин, С.Б. и др. Эксперим. и клин. фармакол. 2007. Т. 70(2). С. 59–64), кровь забиралась через 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 и 240 мин.

Концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама, фабомотизола и фексофенадина в плазме крови кроликов определяли в изократическом обращенно-фазном режиме методом ВЭЖХ с УФ детектированием по оригинальным валидированным методикам. Параметры фармакокинетики веществ рассчитывали модельно-независимым методом (Мирошниченко, И.И. МДМпринт, 2017. 255 с.).

Исследование принадлежности указанных выше препаратов-нейропротекторов к модуляторам функционирования P_{grp} осуществлялось на 11 кроликах в каждой серии (12 – в серии фабомотизола) путем анализа фармакокинетики маркерного субстрата транспортера – фексофенадина (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, Аллегра, Sanofi Aventis, США) (в/ж введение в дозе 67,5 мг/кг) до и после 14-дневного в/ж введения кроликам тестируемого средства трижды в день в следующих дозах: этилметилгидроксипиридина сукцинат – 50 мг/кг (Воронина, Т.А. и др. Эксперим. клин. фармакол. 2006. Т.69(4). С. 6–9); омберацетам – 10 мг/кг массы (Коваленко, Л.П. Эксперим. клин. фармакол. 2002. Т. 65 (1). С. 62–64; Колесников, А.В. и др., Нейрохимия. 2018 (1). С. 70–76); фабомотизол – 3,8 мг/кг массы (Хабриев, Р.У. М.: Медицина, 2005. С. 48–51; Грибакина, О.Г. и др. Эксперим. и клин. фармакол. 2013. Т. 76(3). С. 35–37). Также оценивалось влияние веществ на относительное количество P_{grp} (n=5) в печени, 12-перстной

кишке и лобной доле коры головного мозга методом иммуногистохимии (Malhotra, R. et al. PLoS ONE. 2013. Vol. 8(1). P. 1–9).

Оценка влияния глобальной ишемии мозга (7-дневная односторонняя окклюзия ОСА) на активность Pgr на уровне целостного организма проводилась на 9 кроликах по анализу фармакокинетики фексофенадина после его однократного в/ж введения животным. Также у животных изучался уровень ПОЛ в гемолизате для косвенного подтверждения развития церебральной ишемии.

Анализ активности Pgr в ГЭБ выполнен на 120 крысах разделенных на 4 группы (n=30). 1-й (контрольной) группе внутривенно (в/в) вводили физиологический раствор (660 мкл/кг), через 30 мин – в/в фексофенадин в дозе 10 мг/кг (Jaisue, S., Gerber, J.P., Davey, A.K. Xenobiotica. 2010. Vol. 40(11). P. 743–750). 2-й группе животных 14-дневным курсом через зонд в желудок вводили индуктор Pgr – рифампицин в дозе 20 мг/кг два раза в день (Hashimoto, S. et al. J. Pharm. Health Care Sci. 2018. Vol.4. P. 27; Rana, S.V. et al. Mol. Cell. Biochem. 2006. Vol.289(1-2). P. 39–47), затем на 15-й день в/в вводили фексофенадин. 3-я и 4-я группы животных за 30 мин до в/в введения фексофенадина в/в получали соответственно ингибиторы Pgr – верапамил в дозе 1,65 мг/кг (660 мкл раствора верапамила с концентрацией 2,5 мг/мл на кг массы животного, Биосинтез, Россия) (Fang, W. et al. Neurochem. Int. 2013. Vol. 62(1). P.23–30) или омепразол в дозе 17,6 мг/кг. Животные выводились из эксперимента через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после введения фексофенадина, для анализа у них забиралась кровь из брюшной аорты и кора головного мозга. Кровь центрифугировалась при 1750 g 10 мин для получения плазмы.

Лекарственная форма фексофенадина для парентерального введения отсутствует, в связи с чем производилась экстракция лекарственного вещества из таблеток ацетонитрилом, упаривание органического экстрагента, растворение в воде для инъекций и фильтрование через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Corning, США). Концентрацию полученного

раствора определяли методом ВЭЖХ. Для исследования раствор вводился в хвостовую вену животных в объеме 2 мл/кг.

Количественное определение фексофенадина в плазме крови и гомогенате головного мозга крыс производили методом ВЭЖХ на хроматографической системе «Stayer» с УФ-детектированием при 220 нм. Количество фексофенадина в системном кровотоке и в коре больших полушарий оценивали по площади под кривой концентрация фексофенадина (в крови или ткани коры головного мозга)-время ($AUC_{0-t(\text{плазма})}$ или $AUC_{0-t(\text{мозг})}$), которые рассчитывали методом трапеций. Для оценки функциональной активности Pgr в ГЭБ был рассчитан показатель $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$.

Оценку целесообразности ингибирования Pgr в ГЭБ для повышения эффективности нейропротекторной терапии церебральной ишемии проводили на фоне билатеральной окклюзии ОСА (модель глобальной ишемии) и 60-минутной окклюзии СМА с 24-часовой реперфузией (модель фокальной ишемии) крыс, что объясняется повышенным уровнем транспортера в ткани коры мозга при указанных патологиях. Оценивалась выживаемость и уровень неврологического дефицита животных через 6, 12, 24, 48 и 72 ч после билатеральной окклюзии ОСА, а также зона некроза головного мозга на фоне окклюзии-реперфузии СМА при введении крысам комбинации нейропротектора-субстрата Pgr и ингибитора его активности.

Выживаемость и неврологический дефицит (шкала stroke-index McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (Ганнушкина, И.В. Журнал невропатологии и психиатрии. 1996 (1). С. 14–18)) оценивались на 60 крысах, разделенных на 5 серий: 1-я (n=6) – ложнооперированные (ЛО) животные, 2-я (n=14) – контроль патологии, крысы, которым моделировали билатеральную окклюзию ОСА с в/в введением физиологического раствора за 30 мин до патологии; 3-я (n=13) – животные с аналогичной патологией, которым за 30 мин до ишемии в/в вводили блокатор кальциевых каналов, нейропротектор-субстрат Pgr, нимодипин (раствор для инфузий Нимотоп, Bayer, Германия) в дозе 0,4 мг/кг

(Zhang, L. et al. *Acta Pharmacol. Sin.* 2003. Vol. 24(9). P. 903–906; Wang, X. et al. *J. Basic Med. Sci.* 2017. Vol. 17(3). P. 221–227); 4-я (n=11) – крысы, которым до моделируемой патологии в/в вводили ингибитор активности P_{grp} – омепразол (порошок для инфузий Омез, Dr. Reddy's, Индия) в дозе 17,6 мг/кг массы (Yasar, S. et al. *Am. J. Therapeutics.* 2016. Vol. 23(6). P. 1514–1523; Regardh, C.J. et al. *Scandinavian J. Gastroenterol.* 1985. Vol. 108. P. 79–94; Andersson, T. et al., *Drug Invest.* 1991. Vol. 3(1). P. 45–52); 5-я (n=16) – животные с ишемией, которым профилактически вводили комбинацию нимодипина и омепразола.

Оценка зоны некроза мозга животных при окклюзии-реперфузии СМА выполнена на 33 крысах, разделенных на 4 серии по 7 крыс. 5 животных подвергались «ложной» операции. 1-я серия – животные с 60-минутной ишемией СМА и 24-часовой реперфузией без лечения; 2-я, 3-я, 4-я и 5-я серии – крысы с ишемией-реперфузией и в/в введением в момент реперфузии соответственно нимодипина, омепразола и их комбинации (дозы указаны выше). Для оценки зоны некроза головной мозг крыс окрашивался трифенилтетразолия хлоридом (ТТХ) (Chehrazai, B.V. et al. *Neurosurg.* 1989. Vol. 24 (3). P. 355–360).

Для объяснения причин неэффективности ингибирования P_{grp} в ГЭБ при нейропротекторной терапии фокальной ишемии мозга оценивалась активность транспортера локально в барьере на фоне 30-минутной окклюзии СМА с 24-часовой реперфузией на 30 крысах по степени проникновения фексофенадина в ткань коры головного мозга. Фексофенадин вводился животным в/в в дозе 10 мг/кг в момент реперфузии, после чего анализировалась динамика его концентраций в плазме крови и гомогенате мозга. Также анализировалась целостность самого барьера путем анализа накопления в ткани мозга красителя синего Эванса (Evans blue, Sigma, США) (в/в введение в момент реперфузии 2%-го изотонического раствора; 0,4 мл/100 г крысы). Краситель экстрагировали диметилформамидом (1 мл/100 г ткани) и определяли спектрофотометрически при длине волны 620 нм (Jin, Z. et al. *Am. J. Transl. Res.* – 2019. Vol. 11(8). P.

4683–4695). Группа контроля включала 5 ЛО крыс. 30-минутная окклюзия-реперфузия СМА позволяла изучать функциональную активность Pgr в связи с сохранением жизнеспособности клеток в отличие от часовой окклюзии, при которой выявлен некроз ткани мозга.

Для статистической обработки данных применяли программы «Microsoft Office XP» и Statistica 7.0. Тип распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Различия между значениями T_{\max} фексофенадина оценивали с помощью критерия Вилкоксона. Сравнение других фармакокинетических параметров проводили с применением теста ANOVA после их логарифмирования. Достоверными принимали различия при значении $p < 0,05$. Рассчитывался двусторонний 90%-й доверительный интервал (ДИ) отношения геометрических средних значений фармакокинетических параметров на фоне введения тестируемого вещества или примененной патологии к параметрам интактных животных. Клинически значимыми считали различия, если двусторонний 90%-й ДИ их отношения находится вне диапазона 80–125%.

Результаты иммуногистохимии, данные о площади некроза головного мозга при его окраске ТТХ обрабатывали тестом ANOVA (при нормальном распределении данных) или Крускала-Уоллиса (при распределении данных, отличном от нормального). Межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейлса. Аналогично анализировались результаты при разработке методики анализа активности Pgr в ГЭБ и при оценке влияния окклюзии-реперфузии СМА на его активность в барьере. Зависимость количества Pgr в ткани мозга от показателей ПОЛ и уровня транскрипционных факторов, а также зависимость концентрации веществ от площадей хроматографических пиков оценивали по коэффициенту Пирсона. Выживаемость животных оценивали методом построения кривых выживаемости Каплана-Майера с использованием F-теста Кокса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Функционирование Pgr на фоне нарушений мозгового кровообращения

1. Функционирование Pgr на фоне глобальной ишемии мозга

Методом ГИФА установлено, что билатеральная окклюзия ОСА приводила к заметному, однако недостоверному, снижению уровня Pgr по сравнению с ЛО крысами, затем его количество начинало расти, и к 4-му часу ишемии было выше уровня ЛО животных в 3,55 раза ($p=0,028$). Через 24 ч после окклюзии артерий количество транспортера было статистически значимо выше исходных значений в 3,27 раза ($p=0,047$). Через 72 ч после моделирования патологии его содержание в коре снижалось до значений, не отличающихся от контрольного уровня (таблица 1).

Двусторонняя окклюзия ОСА крыс приводила к активации ПОЛ (таблица 1). Концентрация ТБК-реактивных продуктов в коре головного мозга повышалась через 2 и 4 часа после экспериментального воздействия в 2,78 ($p=0,007$) и в 1,84 раза ($p=0,042$) соответственно, затем снижалась до исходных значений. Уровень SH-групп по сравнению с контрольными значениями имел тенденцию к снижению через 30 минут после окклюзии в 1,97 раза ($p=0,088$), в остальные сроки показатель от контрольных значений не отличался. Активность G-pex снижалась через 30 мин на 21,5% ($p<0,05$) и через 4 часа – на 24,9% ($p<0,05$) по сравнению с исходными значениями.

Таблица 1 – Количество Pgr и выраженность окислительного стресса в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии ОСА

Изучаемый показатель	Серии эксперимента					
	ЛО, (n=5)	Ишемия				
		30 мин (n=5)	2 ч (n=5)	4 ч (n=5)	24 ч (n=5)	72 ч (n=5)
Количество Pgr, нг/мг белка	0,22 (0,16; 0,25)	0,14 (0,06; 0,15)	0,38 (0,21; 0,42)	0,78 (0,40; 0,82)*	0,72 (0,62; 2,08)*	0,22 (0,11; 0,22)
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	24,7 (11,2; 33,1)	31,4 (29,4; 40,2)*	68,6 (59,1; 82,5)*	45,5 (24,2; 79,7)*	47,2 (18,5; 69,1)	34,3 (31,1; 38,7)
SH-группы, мкмоль/мг белка	48,9 (41,4; 64,0)	24,8 (20,0; 43,3)	55,6 (44,0; 72,7)	42,11 (40,1; 53,3)	31,93 (17,3; 68,1)	40,4 (30,4; 41,5)

Продолжение таблицы 1						
Активность G-per, нмоль НАДФН/мг белка*мин	20,5 (18,6; 22,8)	16,1 (12,7; 19,3)*	20,9 (19,2; 27,4)	15,4 (14,3; 18,0)*	17,04 (16,8; 17,1)	20,71 (19,8; 20,0)

Примечание: * – здесь и далее в таблицах 2, 3, 14 достоверные различия по сравнению с показателями ЛО животных ($p < 0,05$). Здесь и в таблицах 2–4, 12–14 данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение при нормальном распределении данных, или в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей – при распределении данных, отличном от нормального. Здесь и далее во всех таблицах показатели, достоверно отличающиеся от контроля, выделены цветом.

Между уровнем Pgr и содержанием ТБК-реактивных продуктов в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии ОСА была выявлена прямая корреляционная зависимость ($r=0,033$; уровень тенденции, $p=0,066$).

гИФА показал, что билатеральная окклюзия ОСА приводила к росту количества Nrf2 через 2 ч в 3,83 раза ($p=0,047$) по сравнению с ЛО крысами, к 4-му часу ишемии его уровень возрастал в 4,05 раза ($p=0,047$). На более поздних сроках ишемии содержание Nrf2 снижалось, однако оставалось выше контроля в 1,29 раза на уровне тенденции ($p=0,076$) через сутки. Через 3 суток уровень Nrf2 достигал исходного показателя (таблица 2).

Билатеральная окклюзия ОСА вела к росту количества HIF-1 α в 32,12 раза ($p=0,083$) через 24 ч после патологии, и в 17,21 раза через 72 часа после воздействия ($p=0,020$). Несмотря на заметное возрастание количества фактора в остальные временные точки, различия с ЛО животными были недостоверны (таблица 2), возможно, из-за межиндивидуальных различий его количества.

Таблица 2 – Количество транскрипционных факторов Nrf2 и субъединицы HIF-1 α транскрипционного фактора HIF-1 в коре головного мозга крыс при билатеральной окклюзии ОСА

Исследуемый показатель	Серии эксперимента					
	ЛО, n=5	Ишемия				
		30 мин, n=5	2 ч, n=5	4 ч, n=5	24 ч, n=5	72 ч, n=5
Количество Nrf2, нг/мг белка	0,021 (0,013; 0,031)	0,011 (0,0052; 0,014)	0,038* (0,028; 0,044)	0,085* (0,015; 0,122)	0,027** (0,023; 0,031)	0,003 (0,002; 0,006)
Количество HIF-1 α , нг/мг белка	0,001 (0,000; 0,011)	0,015 (0,012; 0,029)	0,01 (0,005; 0,023)	0,009 (0,000; 0,036)	0,033** (0,012; 0,046)	0,018* (0,013; 0,048)

Примечания: ** – различия по сравнению с показателями ЛО животных на уровне тенденции ($0,05 < p < 0,1$)

Между уровнем Pgr и количеством Nrf2 в коре головного мозга крыс выявлена прямая зависимость ($r=0,333$; $p=0,047$), корреляционная связь с HIF-1 не наблюдалась.

Таким образом, гипоперфузия головного мозга крыс, вызванная билатеральной окклюзией ОСА, приводит к интенсификации синтеза Pgr в коре головного мозга крыс. Выявленные изменения коррелируют с уровнем ПОЛ. Функционирование Pgr регулируется транскрипционными факторами Nrf2 и HIF-1, причем на ранних этапах ишемии Nrf2 играет превалирующую роль, а на более поздних сроках активируется кислородчувствительный фактор.

2. Функционирование Pgr на фоне фокальной ишемии мозга

ГИФА количества Pgr в коре головного мозга крыс на фоне 30-, 60- и 180-минутной окклюзии СМА без реперфузии показал отсутствие различий по сравнению с ЛО крысами. Увеличение длительности окклюзии до 270 мин вызывало снижение уровня Pgr в коре головного мозга на 35,7% ($p=0,003$). 12-часовая реперфузия не приводила к изменению количества Pgr в коре головного мозга животных во все сроки наблюдения, кроме 4,5-часовой окклюзии, при которой уровень транспортера был ниже контроля на 40,1% (тенденция: $p=0,088$). 30-минутная окклюзия-реперфузия СМА (образцы мозга забирали через 24 после реперфузии) привела к возрастанию уровня Pgr в 9,26 раза по сравнению с ЛО животными ($p=0,011$). Уровень Pgr на фоне 60-минутной окклюзии СМА с 24-часовой реперфузией возрастал на 74,5% ($p=0,018$) по сравнению с контролем. 180- и 270-минутная окклюзия СМА с 24-часовой реперфузией вызывала снижение количества Pgr в коре мозга на 41,1% ($p=0,0002$) и 43,7% ($p=0,021$) по сравнению с контрольными значениями.

30-минутная окклюзия-реперфузия СМА приводила к увеличению концентрации ТБК-реактивных продуктов в гомогенате коры головного мозга в 1,70 раза ($p=0,042$), при часовой окклюзии показатель увеличивался в 3,17 раза ($p=0,009$). Уровень SH-групп по сравнению с контрольными значениями снижался в 1,91 раза ($p=0,011$) при 30-минутной и в 2,55 раза ($p=0,023$) при 60-

минутной окклюзии-реперфузии. Активность G-per достоверно увеличивалась в 1,58 раза ($p=0,044$) только при 30-минутной окклюзии СМА (таблица 3).

Таблица 3 – Количество Pgr и выраженность окислительного стресса в коре головного мозга крыс при окклюзии-реперфузии СМА

Исследуемый показатель	ЛО крысы, n=5	30-мин окклюзия 24-ч реперфузия СМА, n=5	60-мин окклюзия 24-ч реперфузия СМА, n=5
Количество Pgr, нг/мг белка	0,23±0,12	2,13±0,07*	0,37±0,2*
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	24,7 (11,2; 33,1)	42,1 (31,9; 90,4)*	95,11 (78,4; 145,8)*
SH-группы, мкмоль/мг белка	48,9 (41,4; 64,0)	25,7 (18,7; 32,9)*	14,1 (9,8; 23,6)*
Активность G-per, нмоль НАДФН/мг белка*мин	20,16±5,09	31,89±11,02*	24,7±9,1

Методом ГИФА было выявлено, что уровень Nrf2 в коре головного мозга на фоне 30-минутной окклюзии с 24-часовой реперфузией СМА крыс достоверно возрастал в 1,81 раза (с 0,021 нг/мг белка (0,013; 0,031) до 0,038 (0,017; 0,052) нг/мг белка) ($p=0,029$) по сравнению со значением ЛО животных. Часовая-окклюзия с суточной реперфузией не приводила к достоверному росту уровня Nrf2.

Количество HIF-1 α достоверно не различалось между сериями «ложной» операции (0,0010 нг/мг белка (0,000; 0,0105)) и серией окклюзии-реперфузии СМА (0,0198 нг/мг белка (0,000; 0,0587) – 30 минутная окклюзия; 0,0033 нг/мг белка (0,0011; 0,005) – 60-минутная окклюзия). Вероятно, это связано с высокой индивидуальной вариабельностью значений у животных, а также недостаточной степенью кислородного дефицита через сутки после восстановления кровотока.

Корреляционная зависимость между уровнем Pgr в коре головного мозга и количеством Nrf2 и HIF-1, а также интенсивностью ПОЛ определялась при сроках окклюзии-реперфузии СМА, при которых выявлен рост количества белка-транспортера. Была обнаружена прямая зависимость между количеством Pgr и уровнем МДА ($r=0,561$; $p=0,092$) и Nrf2 ($r=0,527$; $p=0,096$) в ткани коры головного мозга на уровне тенденции.

Таким образом, только 30- и 60-минутная окклюзия СМА с 24-часовой реперфузией приводит к росту количества Pgr в коре головного мозга. Более длительная окклюзия вызывает снижение уровня транспортера, что вероятно, вызвано повреждением клеточных мембран. В регуляции синтеза Pgr в коре головного мозга на фоне окклюзии-реперфузии СМА важная роль принадлежит сенсору окислительного стресса – Nrf2.

Оценка принадлежности нейропротекторных лекарственных средств к субстратам и модуляторам активности Pgr

1. Методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов

Количественный анализ этилметилгидроксипиридина сукцината проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Beckman Coulter» (США) с автосамплером «Rheodyne» (США), УФ-детектором и колонкой Суано 4,6x250 мм (зернение 5 мкм) (Beckman Coulter, США), при длине волны 296 нм в изократическом режиме. Температура разделения – 28°C. Подвижная фаза (ПФ) состояла из ацетонитрила и воды деионизированной (20:80) с добавлением триэтиламина до 0,05% и кислоты ортофосфорной до pH 4,5. Скорость потока ПФ – 0,5 мл/мин. Время удерживания целевого вещества составило 18,02±1,23 мин.

Количественный анализ омберацетама и фабомотизола проводили на хроматографе «Stayer» (Россия) с автосамплером «Rheodyne» (США) и УФ-детектором при длинах волн 206 нм (омберацетам) или 302 нм (фабомотизол) в изократическом режиме. Для обоих веществ использовалась колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 35°C. Скорость потока ПФ – 1,0 мл/мин. Состав ПФ для анализа омберацетама: вода деионизированная–ацетонитрил–ледяная уксусная кислота (50–50–0,1), pH=5,5 (время удерживания 10,00±0,11 мин); для анализа фабомотизола: ацетонитрил–вода–метанол–кислота уксусная ледяная–триэтиламин в соотношении 100–240–100–0,3–0,25, pH 6,10 (время

удерживания $9,3 \pm 0,34$ мин). Экстракция этилметилгидроксипиридина сукцината из плазмы крови осуществлялась этилацетатом (1 мл плазмы и 3 мл экстрагента); омберацетама – хлороформом (1,5 мл плазмы и 6 мл экстрагента); фабомотизола – эфиром диэтиловым (1,5 мл плазмы и 6 мл экстрагента) встряхиванием на приборе Shaker в течение 10 мин, центрифугированием при 1750 g 10 мин и упариванием надосадочного слоя. Сухой остаток растворяли в 300 мкл ПФ и 100 мкл раствора вводили в хроматограф. Коэффициент экстракции этилметилгидроксипиридина сукцината – 86,6%, омберацетама – 68%, фабомотизола – 87%.

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов в плазме крови кроликов следующих концентраций: 25, 100, 200, 400, 600 и 800 нг/мл (этилметилгидроксипиридина сукцинат); 5, 15, 25, 50, 100, 200 нг/мл (омберацетам); 10, 50, 100, 200, 400 и 600 нг/мл (фабомотизол), каждый из которых анализировался трижды с построением трех калибровочных графиков зависимости плазменной концентрации вещества от площади его хроматографического пика. Коэффициенты корреляции концентрация-площадь (для этилметилгидроксипиридина сукцината – высота) пиков веществ превышали значение 0,99. Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, не превышали 20% для предела количественного определения и 15% – для всех остальных концентраций. Для анализа точности и прецизионности проводился анализ образцов интактной плазмы крови кроликов с добавкой стандартных растворов до концентраций 25, 100, 400 и 600 нг/мл (этилметилгидроксипиридина сукцинат); 5, 15, 50 и 100 нг/мл (омберацетам); 10, 50, 100 и 400 нг/мл (фабомотизол). Полученные величины прецизионности и точности соответствовали принятым нормам (менее 20% для предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек).

Пики этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола на хроматограммах были отделены от пиков соэкстрактивных

эндогенных соединений, что позволяло достоверно определить исследуемое вещество. Коэффициент разделения пика целевого вещества и ближайшего пика соэкстрактивных веществ составил более 1,5 для омберацетама и более 2 – для фабомотизола и этилметилгидроксипиридина сукцината.

Пределы обнаружения и количественного определения веществ вычислялись как концентрации аналита, дающие соответственно пики с высотами 3-кратно и 10-кратно превышающими высоту пиков шума на расстоянии, 20-кратно превышающем ширину пика на половине его высоты. Данные показатели составили соответственно 25 и 21 нг/мл (этилметилгидроксипиридина сукцинат); 3,0 и 5,0 нг/мл (омберацетам); 4,0 и 10,0 нг/мл (фабомотизол).

Стабильность стандартных растворов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола оценивали путем их хроматографического исследования после трех циклов замораживания 24 часа при -80°C , размораживания при комнатной температуре и разведения до концентрации соответственно 600, 100 и 400 нг/мл. Для оценки стабильности веществ в составе плазмы крови кроликов при хранении в замороженном состоянии в течение 60 дней готовили образцы с концентрациями 800, 200 и 600 нг/мл. Исследовали по 3 независимых образца. При последовательной инъекции пробы плазмы крови кролика с концентрацией этилметилгидроксипиридина сукцината 800 нг/мл, омберацетама 200 нг/мл, а фабомотизола 1000 нг/мл и экстракта чистой плазмы на хроматограмме интактной плазмы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам целевых веществ.

Таким образом, модифицированы и валидированы ВЭЖХ-методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов, которые характеризуются достаточной точностью и прецизионностью и позволяют

анализировать фармакокинетику веществ для оценки их принадлежности к субстратам белка-транспортера Pgp.

2. Принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к субстратам Pgp и модуляторам его функционирования

Параметры фармакокинетики этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола до и после введения индуктора Pgp – рифампицина представлены в таблицах 4, 5, всех трех веществ до и после введения ингибитора транспортера – верапамила – в таблицах 6–8.

Таблица 4 – Параметры фармакокинетики этилметилгидроксипиридина сукцината (100 мг/кг в/ж) после его однократного введения до и после курсового введения рифампицина (20 мг/кг 2 раза в день в/ж)

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=6	Рифампицин 14 дней, n=6
C_{max} , нг/мл	89,5 (37,9; 211,3)	84,8 (33,9; 211,9)
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	669,2 (369,6; 1211,5)	480,2 (219,0; 1048,1)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	694,1 (381,5; 1263,0)	494,5 (229,8; 1064,1)

Примечание: здесь и в таблицах 5–11 данные представлены в виде среднего геометрического и его 95%-го ДИ. Значения T_{max} представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей.

Таблица 5 – Параметры фармакокинетики фабомотизола (3,8 мг/кг в/ж) до и после курсового введения рифампицина (20 мг/кг 2 раза в день в/ж)

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=6	Рифампицин 14 дней, n=6
C_{max} , нг/мл	381,8 (203,0; 718,1)	235,3 (158,1; 350,0)
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	11568,5 (6037,3; 22166,0)	9005,9 (5979,30; 13564,5)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	15768,8 (10440,9; 23815,4)	10625,0 (7556,5; 14942,3)

Таблица 6 – Параметры фармакокинетики этилметилгидроксипиридина сукцината (100 мг/кг в/ж) после его однократного введения до и после курсового введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день в/ж)

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=6	Верапамил 14 дней, n=6
C_{max} , нг/мл	124,7 (36,5; 425,0)	166,4 (115,7; 239,3)
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	350,5 (37,3; 3289,7)	952,7 (601,6; 1508,5)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	361,1 (38,1; 3423,1)	980,8 (613,9; 1567,0)

Таблица 7 – Параметры фармакокинетики омберацетама (50 мг/кг в/ж) до и после введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день в/ж)

Исследуемый показатель	Исходные значения, n=6	Верапамил 14 дней, n=6
C_{max} , нг/мл	49,75 (26,7; 86,4)	29,9 (13,5; 66,5)
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	1390,6 (857,9; 2794,4)	1110,8 (505,0; 2612,9)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	1485,3 (935,5; 2880,2)	1247,6 (639,1; 2616,2)

Таблица 8 – Параметры фармакокинетики фабомотизола (3,8 мг/кг в/ж) до и после курсового введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день в/ж)

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=6	Верапамил 14 дней, n=6
C_{max} , нг/мл	410,6 (346,9; 485,0)	286,8 (211,0; 389,9)
AUC_{0-t} , (нг/мл)*мин	11095,8 (9729,0; 12653,2)	9996,5 (7040,5; 14193,7)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*мин	12412,1 (11626,8; 13250,4)	13430,3 (9758,4; 18483,9)

Отсутствие изменений фармакокинетики этилметилгидроксипиридина сукцината и омберацетама на фоне курсового введения животным модуляторов активности Pgp свидетельствует о том, что тестируемые вещества не являются субстратами транспортера. Тенденция к снижению площади под фармакокинетической кривой ($AUC_{0-\infty}$) фабомотизола при введении рифампицина, вероятно, связана с индукцией микросомальных ферментов печени и интенсификацией метаболизма тест-препарата. На фоне верапамила ни один из параметров фармакокинетики фабомотизола от контрольных значений не отличался. Таким образом, фабомотизол также не является субстратом Pgp.

Динамика фармакокинетических параметров фексофенадина на фоне введения кроликам этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола отражены в таблицах 9–11.

Таблица 9 – Параметры фармакокинетики фексофенадина (67,5 мг/кг в/ж) до и после введения этилметилгидроксипиридина сукцината (50 мг/кг 1 раз в день в/ж) и на 5-й день его отмены

Изучаемый показатель	Интактные кролики, n=6	Этилметилгидроксипиридина сукцинат 14 дней, n=6	Этилметилгидроксипиридина сукцинат 5-й день отмены, n=6
C_{max} , нг/мл	211,3 (184,2; 243,1)	307,6 (250,6; 379,9)*	215,1 (164,1; 281,8)
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	1864,9 (1242,2; 2848,3)	3638,2 (3301,1; 4013,3)*	1724,0 (1196,0; 2487,9)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	2514,2 (1365,2; 4809,3)	6948,0 (3651,4; 13700,1)*	2411,2 (1328,4; 4376,9)

Таблица 10 – Параметры фармакокинетики фексофенадина (67,5 мг/кг в/ж) до и после введения омберацетама (10 мг/кг 1 раз в день в/ж) и на 5-й день его отмены

Изучаемый показатель	Исходные значения, n=6	Омберацетам, 14 дней, n=6	5-й день отмены омберацетама, n=6
C_{max} , нг/мл	241,3 (138,2; 421,3)	360,7 (757,5; 171,8)	331,2 (209,1; 524,9)
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	2520,4 (1012,9; 6271,1)	3023,9 (1682,7; 5433,9)	2799,5 (2318,1; 3380,8)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	4218,6 (1274,5; 13963,2)	4795,5 (2204,1; 10433,0)	4225,2 (2985,2; 5980,3)

Таблица 11 – Параметры фармакокинетики фексофенадина (67,5 мг/кг в/ж) до и после введения животным фабомотизола (3,8 мг/кг 1 раз в день в/ж) и на 5-й день его отмены

Изучаемый показатель	Интактные кролики, n=6	Фабомотизол, 14 дней, n=6	5-й день отмены фабомотизола, n=6
C_{max} , нг/мл	138,3 (66,0; 289,8)	273,3 (146,5; 509,9)	241,9 (65,7; 891,3)
AUC_{0-t} , (нг/мл)*ч	993,9 (553,3; 1785,3)	2038,5 (873,1; 4759,1)	1657,7 (622,7; 4412,6)
$AUC_{0-\infty}$, (нг/мл)*ч	1174,3 (599,1; 2302,0)	2720,9 (1126,6; 6571,3)*	2416,9 (823,6; 7091,0)

14-дневное введение этилметилгидроксипиридина сукцината кроликам вызывало увеличение C_{max} фексофенадина в 1,46 раза (90%-й ДИ 1,23–1,73; $p=0,002$), AUC_{0-24} – в 1,95 раза (90%-й ДИ 1,35–2,78; $p=0,001$), $AUC_{0-\infty}$ – в 2,76

раза (90%-й ДИ 1,19–6,39; $p=0,001$). Данные изменения фармакокинетики фексофенадина свидетельствуют о его накоплении в организме кроликов, что возможно при ингибировании активности Pgp. На 5-й день отмены вещества ни один из фармакокинетических параметров фексофенадина не отличался от значений интактных животных, что демонстрирует возвращение активности Pgp до исходного уровня. Курсовое введение этилметилгидроксипиридина сукцината не вызывало изменений относительного количества Pgp в печени, 12-перстной кишке и головном мозге по сравнению с показателями интактных животных.

Отсутствие изменений фармакокинетики фексофенадина на фоне введения и отмены омберацетама свидетельствует о том, что интенсивность абсорбции маркерного субстрата в кишечнике и его экскреции не изменялись, что характеризует сохранение активности Pgp на исходном уровне. Относительное количество транспортера в органах от контрольных значений также не отличалось.

На фоне курсового введения животным фабомотизола происходило увеличение $AUC_{0-\infty}$ фексофенадина в 2,32 раза (90%-й ДИ 1,35–3,98, $p=0,040$). Остальные параметры фармакокинетики от показателей интактных животных не отличались. Однако имелась выраженная тенденция к возрастанию AUC_{0-t} в 2,051 раза (90%-й ДИ 1,23–3,41, $p=0,054$). На 5-й день отмены фабомотизола параметры фармакокинетики маркерного субстрата Pgp достоверно от значений интактных животных не отличались. Введение кроликам фабомотизола приводило к снижению относительного количества Pgp в мембранах гепатоцитов в 1,31 раза ($p=0,032$) по сравнению с показателями интактных животных. В 12-перстной кишке и коре головного мозга относительное количество транспортера не изменялось.

Таким образом, этилметилгидроксипиридина сукцинат, омберацетам и фабомотизол не являются субстратами Pgp. Это делает препараты безопасными с точки зрения фармакокинетических межлекарственных взаимодействий с

модуляторами активности Pgp и подтверждает незначимое участие транспортера в регуляции их проникновения через ГЭБ. Установлено, что курсовое введение кроликам этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола приводит к ингибированию активности транспортера, что подтверждается характерными изменениями параметров фармакокинетики фексофенадина. Причем фабомотизол, вероятно, снижает активность транспортера опосредованно, влияя на его уровень в гепатоцитах.

Функциональная активность Pgp на уровне целостного организма на фоне глобальной ишемии мозга

Односторонняя окклюзия ОСА у кроликов вызывает ишемию на фоне снижения артериального давления, которое возникает в связи с анестезией комбинацией ксилазина, обладающего симпатолитическим эффектом и золетила (Корнюшенков Е.А., Рос. ветерин. журн. «Мелкие домашние и дикие животные». 2013. (1). С. 33–39). В связи с тем, что активация ПОЛ является типичным следствием церебральной ишемии для косвенного подтверждения ее развития у животных оценивалась интенсивность липопероксидации в гемолизате. В дальнейшем параметры фармакокинетики фексофенадина рассчитывались для 4 животных (кролики 2, 3, 6 и 7) в связи с возрастанием уровня ТБК-реактивных продуктов – основного показателя ПОЛ. У кроликов 1, 4, 5 и 8 данный показатель снижался на фоне снижения уровня SH-групп и роста активности глутатионпероксидазы, что подтверждает компенсированный окислительный стресс. Поэтому указанные животные также использовались в дальнейшем эксперименте. В итоге анализу подверглось 8 кроликов.

Окклюзия ОСА кроликов не вызывала изменений параметров фармакокинетики фексофенадина (таблица 12), что свидетельствует о сохранении активности транспортера на исходном уровне.

Таблица 12 – Параметры фармакокинетики фексофенадина до и после односторонней окклюзии ОСА

Исследуемый показатель	Интактные кролики, n=8	Ишемия, n=8
C_{max} , нг/мл	150,1 (126,9; 177,7)	177,0 (132,7; 238,7)

Продолжение таблицы 12		
AUC _{0-t} , (нг/мл)*ч	2224,6 (1689,1; 2929,8)	2324,7 (1664,5; 3246,9)
AUC _{0-∞} , (нг/мл)*ч	8582,0 (2894,3; 25452,8)	4332,6 (2399,3; 7823,7)

Таким образом, активность Pgr на уровне целостного организма не изменяется на фоне ишемии головного мозга у кроликов. Это позволяет использовать такой показатель, как содержание маркерных субстратов белка-транспортера в головном мозге животных в качестве характеристики его функциональной активности в ГЭБ при моделировании ишемических патологий.

Методика оценки функциональной активности Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга

1. Валидация методики количественного определения фексофенадина в плазме крови и гомогенате головного мозга крыс

При анализе концентрации фексофенадина в плазме крови и гомогенате головного мозга у крыс использовался высокоэффективный жидкостный хроматограф «Stayer» (Россия) с инжектором «Rheodyne» (США) и УФ спектрофотометрическим детектором при длине волны 220 нм в изократическом режиме. Применялась хроматографическая колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45°C. Скорость потока ПФ – 1,0 мл/мин. Состав ПФ: вода деионизированная–ацетонитрил–уксусная кислота (50 – 50 – 0,1), рН=5,5. Время удерживания фексофенадина в обеих тканях составило 14,91±0,25 мин.

Для выделения фексофенадина к 1,5 мл плазмы крови прибавляли 4 мл ацетонитрила, встряхивали на приборе Shaker 15 мин, центрифугировали при 1750 g 15 мин и упаривали супернатант при 50°C. Коэффициент извлечения вещества составил 83,6%. Для экстракции фексофенадина из мозга образцы ткани массой 0,5 г гомогенизировали в 500 мкл воды деионизированной в течение 1 мин, после чего осаждали белок 4 мл ацетонитрила путем встряхивания на приборе Vortex в течение 15 мин с последующим центрифугированием 15 мин при 1750 g и забором надосадочного слоя для анализа. Степень извлечения целевого вещества составляла 81,3%.

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов фексофенадина с концентрациями 100, 400, 800, 2000, 10000 и 17000 нг/мл (плазма крови) или 50, 250, 500, 750, 1000 и 2000 нг/мл (гомогенат головного мозга). Растворы анализировались троекратно. По полученным значениям строились три калибровочных графика зависимости концентрации фексофенадина в плазме крови от площади его хроматографического пика. Коэффициенты корреляции составили более 0,99. Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, не превышали 20% для предела количественного определения и 15% – для более высоких концентраций.

Для анализа точности и прецизионности выполняли анализ образцов интактной ткани с добавлением стандартных растворов фексофенадина до получения концентраций 100, 800, 2000 и 10000 нг/мл (плазма крови) или 50, 500, 750 и 1000 нг/мл (гомогенат головного мозга). Величины прецизионности и точности соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек).

На хроматограммах пики фексофенадина отделены от пиков соэкстрактивных веществ, что позволяет достоверно определить анализируемое соединение. Коэффициент разрешения (разделения) пика целевого вещества и ближайшего пика соэкстрактивных веществ составил более 2. Пределы обнаружения и количественного определения фексофенадина при помощи используемых аналитических методик составили соответственно 12 нг/мл и 100 нг/мл (плазма крови) и 35 и 50 нг/мл (гомогенат головного мозга).

Стабильность стандартных растворов фексофенадина оценивали путем их хроматографического исследования после трех циклов замораживания/размораживания. Каждый цикл замораживания длился 24 часа в морозильной камере при -80°C и размораживании при комнатной температуре не более двух часов. Подобная схема объясняется возможным частым размораживанием и замораживанием стандартных образцов в процессе

исследования. Анализ проводили троекратно. Для оценки стабильности фексофенадина в составе плазмы крови при хранении в замороженном состоянии готовили образцы с концентрацией 17000 нг/мл. Образцы анализировали после хранения в замороженном состоянии в течение 60 дней. При последовательном анализе пробы с концентрацией фексофенадина 17000 нг/мл (плазма крови) или 2000 нг/г (гомогенат головного мозга) и образца чистой плазмы крови или гомогената мозга крыс на хроматограммах интактных тканей отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам фексофенадина, что свидетельствует об отсутствии переноса пробы.

Таким образом, модифицированы и валидированы методики количественного определения маркерного субстрата Pgp – фексофенадина в плазме крови и гомогенате головного мозга крыс, которые позволяют анализировать его фармакокинетику с целью определения функциональной активности данного белка-транспортера на уровне целостного организма, а также локально в ГЭБ по дополнительной оценке накопления фексофенадина в головном мозге.

2. Функциональная активность Pgp в ГЭБ в норме и на фоне введения классических индуктора и ингибиторов транспортера

Активность Pgp в ГЭБ оценивалась по степени проникновения его маркерного субстрата – фексофенадина в ткань коры головного мозга после его однократного в/в введения крысам. Для апробации методики активность Pgp в ГЭБ анализировали у интактных животных, а также после введения индуктора (рифампицин) и ингибиторов (верапамил и омепразол) транспортера.

Концентрация фексофенадина в плазме крови крыс через 5 мин после его введения в дозе 10 мг/кг массы (контроль) составила $16,2 \pm 4,3$ мкг/мл, затем снижалась и достигала $1,0 \pm 0,4$ мкг/мл к 60 мин исследования. Рифампицин и омепразол не влияли на уровень фексофенадина в плазме крови крыс ни в одну из временных точек. Площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время ($AUC_{0-t(\text{плазма})}$) фексофенадина также не различалась между сериями

контроля и введения рифампицина или омепразола. Верапамил также достоверно не изменял концентрацию фексофенадина в плазме крови, однако $AUC_{0-t(\text{плазма})}$ в данной серии по сравнению с контролем была выше на 56,49% ($p=0,019$), что подтверждает снижение активности Pgp в печени – основном органе, ответственном за фармакокинетику маркерного субстрата транспортера при его в/в ведении (таблица 13).

Таблица 13 – Значения площадей под кривыми фармакокинетики фексофенадина (10 мг/кг в/в) в гомогенате коры головного мозга и плазме крови крыс, а также соотношение указанных параметров в контроле, на фоне введения рифампицина (20 мг/кг в/ж 2 раза в день в течение 14 дней), верапамила (1,65 мг/кг в/в однократно) и омепразола (17,6 мг/кг в/в однократно)

Серия эксперимента	Параметр		
	$AUC_{0-t(\text{плазма})}$, мкг/(мл*ч)	$AUC_{0-t(\text{мозг})}$, мкг/(г*мин)	$AUC_{0-t(\text{мозг})}/AUC_{0-t(\text{плазма})}$
Контроль, n=30	186,8±66,4	16,2±3,7	0,09±0,05
Рифампицин, n=30	229,3±41,1	5,9±1,6*	0,03±0,01*
Омепразол, n=30	162,3±53,1	24,1±4,3*	0,15±0,04*
Верапамил, n=30	292,4±29,5*	17,3±5,6	0,06±0,02

Примечание: * – достоверные различия с группой контроля

Фексофенадин в коре головного мозга контрольных крыс детектировался через 5 мин после его в/в введения в дозе 10 мг/кг массы: его концентрация составляла 320,9±140,0 нг/г, достигала максимума через 15 мин – 399,9±156,5 нг/г и снижалась к 60 мин исследования до 166,2±31,7 нг/г. Применение рифампицина приводило к снижению концентрации фексофенадина в коре головного мозга крыс через 15 мин более чем в 4 раза ($p=0,009$), через 30 мин – более чем в 5,6 раза ($p=0,012$) и через 45 мин – в 2,85 раза ($p=0,042$) по сравнению с показателями контрольных животных. Введение верапамила не оказало влияния на концентрацию фексофенадина в коре головного мозга ни в одну из временных точек, а омепразол повышал концентрацию фексофенадина в коре головного мозга через 5 мин после введения последнего в 2,96 раза ($p=0,009$) по сравнению с показателями крыс, которым вводили только фексофенадин.

Также была рассчитана площадь под кривой концентрация фексофенадина в коре мозга-время ($AUC_{0-t(\text{мозг})}$), которая характеризует общее количество вещества, поступившее в ткань мозга. Введение рифампицина снижало AUC_{0-t}

$t_{(\text{мозг})}$ фексофенадина в 2,74 раза ($p=0,005$), а применение омепразола увеличивало показатель в 1,49 раза ($p=0,012$). Верапамил не влиял на данный параметр из-за гипоперфузии мозга, связанной с зафиксированным в эксперименте снижением артериального давления. Отношение $AUC_{0-t_{(\text{мозг})}}/AUC_{0-t_{(\text{плазма})}}$ уменьшалось при применении рифампицина в 3,36 раза ($p=0,003$), а при использовании омепразола возрастало в 1,71 раза ($p=0,003$).

Таким образом, на фоне введения крысам модуляторов функциональной активности Pgr проницаемость ГЭБ для фексофенадина соответствующим образом меняется: индуктор Pgr рифампицин снижает интенсивность проникновения фексофенадина в ткань мозга, а ингибитор омепразол приводит к противоположной динамике. Полученные результаты позволяют использовать указанные препараты, дозы и схемы их введения для моделирования состояний повышенной или пониженной функциональной активности Pgr в ГЭБ.

Оценка целесообразности ингибирования Pgr в ГЭБ при нарушениях мозгового кровообращения

1. Выживаемость и уровень неврологического дефицита животных при билатеральной окклюзии ОСА при применении нейропротектора-субстрата и ингибитора Pgr

В качестве нейропротектора был выбран блокатор кальциевых каналов нимодипин, который является субстратом изучаемого белка-транспортера (Zhang, L. et al. Acta Pharmacol. Sin. 2003. Vol. 24(9). P. 903–906) и обладает вазоактивными свойствами.

За весь срок наблюдения не погибла ни одна крыса, подвергнутая «ложной» операции. В контрольной группе первая гибель наблюдалась через 4 часа после операции, через 24 ч погибла половина крыс. В/в введение нимодипина до моделирования патологии приводило к сокращению летальности животных по сравнению с контролем патологии на уровне тенденции ($p=0,098$). Ингибитор Pgr омепразол не вызывал достоверных

изменений количества погибших крыс по сравнению с контролем патологии. Комбинация нимодипина и омепразола привела к снижению летальности по сравнению с контролем патологии ($p=0,001$), а также по сравнению с серией введения нимодипина ($p=0,046$).

У ЛО животных признаков неврологического дефицита не выявлено, за исключением незначительных изменений через 4 ч, которые были вызваны, возможно, «выходом» из наркоза. Балл неврологического дефицита в группе контроля патологии возрастал до конца первых суток наблюдения, затем снижался, но во все сроки, за исключением 4 ч, относился к тяжелой степени.

Введение омепразола до моделирования патологии не приводило к сокращению уровня неврологического дефицита по сравнению с контролем патологии ни в один из экспериментальных сроков. Крысы, получавшие нимодипин, имели более низкий балл неврологического дефицита по сравнению с контрольными животными: через 24 ч он был ниже на 88,2% ($p=0,049$), а через 4 и 72 ч – на 44,4% и 16% соответственно на уровне тенденции ($p=0,075$). Комбинация нимодипина и омепразола приводила к более низким баллам неврологического дефицита по сравнению с контролем патологии через 4, 12, 24, 48 и 72 ч на 87,5% ($p=0,003$), 80,0% (уровень тенденции, $p=0,050$), 88,2% ($p=0,002$), 86,7% ($p=0,030$) и 85,7% ($p=0,025$) соответственно; по сравнению с группой введения омепразола – через 4, 24, 48 и 72 ч ниже на 60,0% ($p=0,043$), 71,4% ($p=0,003$), 90,0% ($p=0,002$) и 90,5% ($p=0,005$) соответственно. По сравнению с введением нимодипина через 4 ч уровень неврологического дефицита был ниже на 60,0% ($p=0,043$), а через 48 ч – на 66,7% ($p=0,049$).

Таким образом, фармакологическое ингибирование функциональной активности Pgr в ГЭБ на фоне билатеральной окклюзии ОСА является целесообразным для повышения эффективности нейропротекторной терапии последствий глобальной ишемии мозга, видимо, за счет интенсификации доставки в ткани мозга нейропротекторных средств-субстратов транспортера.

2. Оценка зоны некроза мозга животных при окклюзии-реперфузии СМА при комбинированном применении нейропротектора-субстрата и ингибитора Pgr

В группе ЛО животных смертность отсутствовала. Летальность животных после 60-минутной окклюзии СМА с последующей 24-часовой реперфузией составила 20–30% и в экспериментальных группах не отличалась. Примененная модель патологии привела к формированию очага некроза в головном мозге контрольных крыс площадью $32,2 \pm 7,1\%$. В/в введение животным нейропротектора с вазоактивными свойствами – нимодипина в момент реперфузии приводило к снижению размера некротического очага на 27,7% по сравнению с группой контроля патологии ($p=0,002$). В/в введение животным ингибитора Pgr – омепразола не вызвало изменения площади некроза мозга. Комбинированное последовательное в/в введение нимодипина и омепразола вызвало снижение площади некроза по сравнению с контролем на 28,8% ($p=0,009$), по сравнению с группой омепразола – на 33,2% ($p=0,003$), однако по сравнению с серией изолированного введения нимодипина различий выявлено не было.

Таким образом, направленное снижение активности Pgr в ГЭБ омепразолом не уменьшает зону некроза мозга при использовании для нейропротекторной терапии последствий фокальной ишемии мозга нимодипина – субстрата транспортера.

3. Функциональная активность Pgr в ГЭБ на фоне окклюзии-реперфузии СМА

Активность Pgr в ГЭБ на фоне 30-минутной окклюзии СМА с последующей 24-часовой реперфузией оценивали по степени проникновения в головной мозг фексофенадина после его однократного в/в введения крысам. Контролем в эксперименте служили ЛО крысы. Данный этап исследования выполнялся как попытка объяснить неэффективность ингибирования транспортера в ГЭБ при изучаемой патологии с целью повышения фармакологической активности вещества-субстрата Pgr, обладающего нейропротекторным и вазоактивным потенциалом.

Концентрация фексофенадина в плазме крови ЛО крыс через 5 мин после его в/в введения в дозе 10 мг/кг массы (контроль) составила $13,5 \pm 1,0$ мкг/мл. Затем уровень вещества снижался и достигал значения $1,3 \pm 0,23$ мкг/мл к первому часу исследования. Моделирование окклюзии-реперфузии СМА не изменяло содержание фексофенадина в плазме крови: его концентрация в исследуемые временные точки и площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время ($AUC_{0-t(\text{плазма})}$) не отличались от показателей контроля.

У ЛО животных уровень фексофенадина в коре головного мозга возрастал после его в/в введения, достигая максимума (789,9 нг/г) через 15 мин, и постепенно снижался к 1-му часу эксперимента. Окклюзия-реперфузия СМА вызывала рост концентрации тест-вещества в коре головного мозга крыс через 5 мин после его введения в 4,97 раза ($p=0,027$), через 10 мин – в 1,97 раза ($p=0,049$), через 30 мин – в 3,03 раза ($p=0,027$), через 45 мин – в 6,17 раза ($p=0,027$) и через 60 мин – в 17,84 раза ($p=0,027$) по сравнению с контролем. Площадь под кривой «концентрация фексофенадина в коре головного мозга-время» ($AUC_{0-t(\text{мозг})}$) в ишемизированном полушарии была выше аналогичного показателя контрольных животных в 3,19 раза ($p=0,027$).

Отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})}/AUC_{0-t(\text{плазма})}$ в ишемизированном полушарии животных с окклюзией-реперфузией СМА превышало показатель ЛО животных в 2,52 раза ($p=0,027$) (таблица 14).

Таблица 14 – Усредненные значения площадей под фармакокинетическими кривыми фексофенадина в гомогенате коры головного мозга и плазме крови крыс, а также соотношение указанных параметров в сериях «ложной» операции и окклюзии-реперфузии СМА

Серия эксперимента	Параметр		
	$AUC_{0-t(\text{плазма})}$, нг/(мл*ч)	$AUC_{0-t(\text{мозг})}$, нг/(г*мин)	$AUC_{0-t(\text{мозг})}/AUC_{0-t(\text{плазма})}$
Кора ЛО животных, n=5	$222,7 \pm 23,3$	$19,9 \pm 1,6$	$0,09 \pm 0,01$
Кора на стороне окклюзии СМА, n=5	$307,2 \pm 105,5$	$63,6 \pm 16,0^*$	$0,23 \pm 0,10^*$

Таким образом, проницаемость ГЭБ для фексофенадина – маркерного субстрата Pgp на фоне окклюзии-реперфузии СМА крыс повышается, что может свидетельствовать, с одной стороны, о снижении функциональной

активности белка-транспортера в ГЭБ, а, с другой – быть следствием нарушения структуры и проницаемости барьера.

4. Проницаемость ГЭБ на фоне окклюзии-реперфузии СМА

Для проверки гипотезы о повышении проницаемости ГЭБ на фоне окклюзии-реперфузии СМА был выполнен эксперимент, регистрирующий накопление азокрасителя Evans blue в ткани мозга экспериментальных животных. 30-минутная окклюзия СМА крыс с суточной реперфузией приводила к нарушению проницаемости ГЭБ, что подтверждается накоплением в ишемизированной ткани головного мозга животных красителя, который в норме в ЦНС не проникает (Jin Z. et al. Am. J. Transl. Res. 2019. Vol. 11(8). P. 4683–4695). Уровень красителя в головном мозге на фоне окклюзии-реперфузии СМА превышал аналогичный показатель ЛО животных в 4,83 раза ($p=0,042$).

Таким образом, в эксперименте доказано повышение проницаемости ГЭБ на стороне ишемии на фоне 30-минутной окклюзии и 24-часовой реперфузии СМА, что объясняет неэффективность стратегии фармакологического ингибирования Pgr в ГЭБ при данной патологии вследствие нарушения структуры барьера.

Выводы

1. Билатеральная окклюзия ОСА крыс (модель глобальной ишемии мозга) приводит к возрастанию абсолютного количества Pgr в коре головного мозга, начиная с 4-го и до 48-го ч ишемии, что сопровождается увеличением уровня транскрипционных факторов Nrf2 (через 2 и 4 часа) и NIF-1 (через 72 ч) и коррелирует с уровнем окислительного стресса и количеством Nrf2 в ткани коры головного мозга.

2. 30- и 60-минутная окклюзия СМА крыс с последующей реперфузией (модель фокальной ишемии мозга) приводит к возрастанию абсолютного количества Pgr в коре головного мозга через 24 ч после реканализации, что сопровождается увеличением уровня транскрипционного фактора Nrf2 и развитием выраженного окислительного стресса в ткани коры

головного мозга. При использовании более продолжительной фокальной ишемии мозга (3 часа окклюзии СМА с суточной реперфузией, 4,5 часа окклюзии без реперфузии и с реперфузией в течение 12 и 24 ч) наблюдается снижение абсолютного количества Pgr в ткани мозга.

3. Модифицированы и валидированы ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов, которые отличаются точностью и прецизионностью.

4. Этилметилгидроксипиридина сукцинат, омберацетам и фабомотизол не являются субстратами Pgr. Этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол ингибируют функциональную активность Pgr на уровне целостного организма. Омберацетам не изменяет функционирование Pgr на уровне целостного организма.

5. Односторонняя окклюзия ОСА кроликов в течение 7 дней не приводит к изменению фармакокинетики маркерного субстрата Pgr – фексофенадина после его однократного в/ж введения (67,5 мг/кг), что свидетельствует о сохранении активности белка-транспортера на уровне целостного организма на исходном уровне.

6. Функциональная активность Pgr в ГЭБ коры головного мозга крыс повышается на фоне 14-дневного в/ж введения крысам классического индуктора Pgr – рифампицина (20 мг/кг 2 раза в день) и снижается на фоне однократного в/в введения ингибитора Pgr – омепразола (17,6 мг/кг), что подтверждается динамикой концентрации в коре головного мозга животных маркерного субстрата белка-транспортера – фексофенадина после его однократного в/в введения (10 мг/кг).

7. Однократное в/в введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата Pgr – нимодипина (0,4 мг/кг) совместно с ингибитором транспортера – омепразолом (17,6 мг/кг) за 30 мин до билатеральной окклюзии ОСА (модель глобальной ишемии мозга) повышает выживаемость и снижает уровень

неврологического дефицита животных по сравнению с изолированным введением нимодипина.

8. Однократное в/в введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата P_{gr} – нимодипина (0,4 мг/кг) совместно с ингибитором транспортера – омепразолом (17,6 мг/кг) в момент реперфузии при окклюзии-реперфузии СМА (модель фокальной ишемии мозга) не уменьшает величину зоны некроза головного мозга по сравнению с изолированным введением нимодипина, что связано со снижением роли P_{gr} в функционировании поврежденного ГЭБ, несмотря на повышение его количества в ткани коры головного мозга.

Практические рекомендации

Повышение количества P_{gr} в головном мозге на фоне билатеральной окклюзии ОСА крыс создает предпосылки для корректировки доз лекарственных средств-субстратов транспортера в сторону увеличения при фармакотерапии ишемических заболеваний мозга.

Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к числу субстратов P_{gr} показала, что их фармакокинетика не зависит от функционирования транспортера и характеризует возможность их безопасного применения в комбинации с веществами, модулирующими его активность, а также на фоне патологий, оказывающих подобное действие. Ингибирующий потенциал этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола по отношению к P_{gr} позволяет рекомендовать данные средства для прогнозирования принадлежности к субстратам P_{gr} новых лекарственных веществ на этапе доклинических исследований. В случае подтверждения их ингибирующей активности по отношению к P_{gr} в клинических испытаниях целесообразно учитывать возможность фармакокинетических взаимодействий между препаратами и средствами сопутствующей фармакотерапии, являющимися субстратами транспортера.

Апробированная методика анализа функциональной активности P_{gr} в ГЭБ может быть рекомендована в качестве способа оценки локального

ингибирующего потенциала тестируемых лекарственных веществ по отношению к транспортеру.

Повышение выживаемости животных при двусторонней окклюзии ОСА при комбинированном введении нимодипина и омепразола (нейропротектора-субстрата и ингибитора P_{gp} соответственно) по сравнению с изолированным использованием нимодипина показывает перспективность подавления активности транспортера на фоне глобальной ишемии мозга. В качестве ингибиторов транспортера целесообразно использовать этилметилгидроксипиридина сукцинат или фабомотизол в связи с наличием у препаратов собственной нейропротекторной активности и их высокой безопасностью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ

1. Структура, функции гликопротеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, Н.М. Попова, **И.В. Черных**, Д.С. Титов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т.12, №2. – С.3–11.
2. Функциональная активность и экспрессия гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, **И.В. Черных**, Д.С. Титов // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – Т.22, №2. – С.75–78.
3. Гликопротеин-Р: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Н.М. Попова // Успехи физиологических наук. – 2014. – Т.45, №4. – С.90–99.
4. Половые различия функциональной активности и экспрессии гликопротеина-Р у кроликов / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, А.А. Котлярова, А.А. Никифоров // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т.100, №8. – С. 944–952.
5. Разработка ВЭЖХ методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови крыс и кроликов / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога, П.Ю. Мыльников // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2015. – Т.23, №1. – С.62–66.
6. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2015, №3. – С.49–53.
7. Экспрессия гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при двусторонней окклюзии общих сонных артерий / **И.В. Черных**, Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.Ю. Виноградов, Д.С. Титов // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2015. – Т.29, №4 (201). – С.91–95.
8. Якушева Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, **И.В. Черных** // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т.78, №5. – С.19–23.

9. Влияние гипоксии различных видов на функциональную активность и экспрессию гликопротеина Р / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Н.М. Попова // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2016. – Т.14, №1. – С.71–77.

10. Роль гликопротеина-Р в неврологии / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова // *Журнал неврологии и психиатрии С.С. Корсакова*. – 2017. – Т.117, №1. – С.67–71.

11. Анализ принадлежности препарата ноопепт к субстратам и модуляторам функциональной активности ABCB1-белка в эксперименте *in vivo* / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Гацанога // *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*. – 2017. – Т.25, №1. – С.30–41.

12. Разработка ВЭЖХ-методики количественного анализа фабомотизола (афобазола) в плазме крови кроликов / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога // *Вестник РУДН. Серия: Медицина*. – 2017. – Т.21, №4. – С.432–439.

13. Изучение принадлежности фабомотизола к субстратам гликопротеина-Р / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Гацанога, Н.М. Попова // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. – 2017. – Т.25, №4. – С.538–550.

14. Влияние афобазола на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-Р в эксперименте / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2017. – Т.80, №9. – С.69–72.

15. Оценка принадлежности лекарственных препаратов к ингибиторам и индукторам белка-транспортера гликопротеина-Р в эксперименте *in vivo* / Е.Н. Якушева, Д.А. Сычев, А.В. Щулькин, **И.В. Черных**, М.В. Гацанога // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2018. – Т.81, №1. – С.17–23.

16. Функциональная активность гликопротеина-Р на фоне ишемии головного мозга / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога, Н.М. Попова, А.С. Есенина, М.М. Градинарь, Е.Н. Якушева // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. – 2019. – Т.7, №1. – С.46–52.

17. Метод анализа функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога, Н.М. Попова, Е.Н. Якушева // *Нейрохимия*. – 2019. – Т.36, №1. – С.84–88.

18. Влияние афобазола на функциональную активность ABCB1-белка у добровольцев с низкой тревожностью / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога, А.А. Никифоров // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2019. – Т.82, №3. – С.17–21.

19. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне ишемии–реперфузии головного мозга / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, А.С. Есенина, М.М. Градинарь, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2019. – Т.105, №5. – С.657–664.

20. Ингибирование активности ABCB1-белка при нарушении мозгового кровообращения может повысить эффективность фармакотерапии / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, С.К. Правкин, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2021. – Т.15, №1. – С.65–70.

Статьи в журналах и сборниках

21. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы шиншилла / М.В. Гацанога, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова // *Наука молодых – Eruditio Juvenium*. – 2016, №3. – С.5–10.

Тезисы докладов

22. Зависимость экспрессии гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере от выраженности окислительного стресса в коре больших полушарий при окклюзии общей сонной артерии / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, Н.М. Попова // Тезисы докладов IX Международной конференции «Биоантиоксидант». – М. – 2015. – С.207.
23. Влияние ишемии и ишемии/реперфузии на экспрессию в гематоэнцефалическом барьере белка-транспортера лекарственных веществ гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, И.Ю. Виноградов // Материалы одиннадцатого международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – Судак. – 2015. – С.457.
24. Влияние метаболических препаратов на функционирование ABCB1-белка / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, Н.М. Попова, Д.О. Уткин // Материалы ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. – Рязань. – 2016. – С.410–412.
25. Функциональная активность гликопротеина-Р на фоне ишемического инсульта / Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога // Материалы Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием. В сборнике: Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева. – 2016. – С.84–86.
26. Влияние ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга на экспрессию белка-транспортера лекарственных средств гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, **И.В. Черных**, М.В. Гацанога // Тезисы докладов VI Всероссийской с международным участием школы-конференции «Физиология кровообращения». – Москва. – 2016. – С.188–189.
27. Влияние отечественных метаболических препаратов на функциональную активность гликопротеина-Р / А.В. Щулькин, **И.В. Черных**, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова, Д.О. Уткин // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т.3, №4. – С.73.
28. Экспрессия гликопротеина-Р в коре больших полушарий головного мозга на фоне ее ишемии / **И.В. Черных**, Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога // Материалы II Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов. ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова. В сборнике: Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста. – Рязань. – 2016. – С.217.
29. Методика оценки принадлежности лекарственных препаратов к субстратам, индукторам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, М.В. Гацанога, Н.М. Попова // Материалы II Всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты». – Томск. – 2017. – С.34.
30. Трансляционная модель для оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р в эксперименте / А.В. Щулькин, **И.В. Черных**, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога, Н.М. Попова, Е.Н. Якушева // Материалы шестой конференции RUS-LASA. – Рязань. – 2017. – С.32–33.
31. Способ тестирования лекарственных препаратов на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р / А.В. Щулькин, **И.В. Черных**, Е.Н. Якушева, М.В. Гацанога // Сборник материалов 21-1 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2017. – С.247.
32. Влияние отечественных нейропротекторных средств на функциональную активность ABCB1-белка / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Воронеж. – 2017. – С.370–371.

33. Экспрессия белка-транспортера гликопротеина-Р в коре лобной доли крыс при гипоксии разных видов / **И.В. Черных**, Е.Н. Якушева, И.Ю. Виноградов, А.В. Шулькин // Материалы всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии». – Рязань. – 2017. – С.62–63.
34. Трансляционная модель для оценки принадлежности лекарственных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-р в эксперименте / А.В. Шулькин, **И.В. Черных**, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога, Н.М. Попова, Е.Н. Якушева // *Russian Scientist*. – 2017. – Т.1, №2(2). – С.32–33.
35. Оценка принадлежности ноопепта к субстратам, индукторам и ингибиторам гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, М.В. Гацанога, **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников // Материалы российской научной конференции, посвященной 125-летию академика С.В. Аничкова «Фармакология регуляторных нейропептидов». – СПб. – 2017. – С.83.
36. Исследование афобазола как субстрата и модулятора активности АВСВ1-белка / М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева, **И.В. Черных**, А.В. Шулькин // Материалы III Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. В книге: Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста. – Рязань. – 2017. – С.164–166.
37. **Черных, И.В.** Экспрессия гликопротеина-Р при ишемии головного мозга / **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева // Материалы XVII Всероссийского симпозиума «Эколого-физиологические проблемы адаптации». – Рязань. – 2017. – С.241–242.
38. Изучение принадлежности афобазола к субстратам гликопротеина-Р / **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Гацанога, А.С. Есенина, М.М. Градинарь // Материалы Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний». – Рязань. – 2017. – С.254–255.
39. Влияние гипоксической гипоксии на функциональную активность АВС1-белка // **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.А. Гацанога // Сборник научных статей 65 годичной международной научно-практической конференции Таджикского государственного медицинского университета имени Абуали ибни Сино «Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире». – Душанбе. – 2017. – Т.2. – С.511–513.
40. Влияние мексидола на функциональную активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере / **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева, А.С. Есенина, М.М. Градинарь // Сборник тезисов 22-й Международной пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2018. – С.247.
41. Влияние мексидола на функциональную активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере головного мозга крыс / **И.В. Черных**, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога, А.С. Есенина, Е.Н. Якушева // Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – Ярославль, 2018. – С.264.
42. Методы оценки принадлежности лекарственных препаратов к субстратам, индукторам и ингибиторам АВСВ1-белка / Е.Н. Якушева, А.В. Шулькин, **И.В. Черных**, М.В. Гацанога, Н.М. Попова // Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – Ярославль, 2018. – С.279.
43. Функционирование АВСВ1-белка в гематоэнцефалическом барьере на фоне введения мексидола / А.В. Шулькин, **И.В. Черных**, Е.Н. Якушева, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацанога, А.С. Есенина, М.М. Градинарь // Материалы международной конференции «Психофизиология и психоэндокринология». – Ставрополь, 2018. – С.143–144.

44. Влияние мексидола на функционирование ABCB1-белка в гематоэнцефалическом барьере / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацаного, Е.Н. Якушева, А.С. Есенина, М.М. Градинарь // Материалы XIV международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – Судак. – 2018. – С.515–516.
45. Влияние отечественных нейропротекторов на функциональную активность и экспрессию белка-транспортера гликопротеина-P / А.В. Щулькин, **И.В. Черных**, П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева // Материалы XIV международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – Судак. – 2018. – С.552–553.
46. **Черных, И.В.** Ингибирование гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере как метод повышения эффективности фармакотерапии острого нарушения мозгового кровообращения / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, М.В. Гацаного, П.Ю. Мыльников, А.С. Есенина, М.М. Градинарь, Е.Н. Якушева // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки». – Рязань. – 2018. – С.105–106.
47. Снижение функциональной активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере на фоне введения мексидола / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева А.С. Есенина, М.М. Градинарь, П.Ю. Мыльников // Сборник тезисов Медицинского профессорского форума «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении». Сборник тезисов Медицинского профессорского форума «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении». – Ярославль. – 2018. – С.81.
48. Щулькин, А.В. Подходы к тестированию веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, **И.В. Черных** // Сборник тезисов Медицинского профессорского форума «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении». Сборник тезисов Медицинского профессорского форума «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении». – Ярославль. – 2018. – С.75.
49. Влияние отечественных нейропротекторов на активность и экспрессию белка-транспортера р-гликопротеина / А.В. Щулькин, Н.С. Косицына, **И.В. Черных**, П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т.17, №5. – С.87.
50. ABCB1-белок как фармакологическая мишень при терапии последствий нарушения мозгового кровообращения / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Гацаного, А.С. Есенина, М.М. Градинарь, А.С. Бирюкова // Материалы XV международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – Судак. – 2019. – С.454.
51. Способ оценки функциональной активности Р-гликопротеина в гематоэнцефалическом барьере / **И.В. Черных**, А.В. Щулькин, П.Ю. Мыльников, М.В. Гацаного, А.А. Сеидкулиева // Сборник тезисов 23-й Международной пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино. – 2019. – С.111.

Список сокращений

$AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до бесконечности;
в/в – внутривенно;
в/ж – внутрижелудочно;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
ГИФА – гетерогенный иммуноферментный анализ;
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер;
ДИ – доверительный интервал;
ЛО – ложноперирированный;
ОСА – общая сонная артерия;
ПОЛ – перекисное окисление липидов;
ПФ – подвижная фаза;
СМА – средняя мозговая артерия;
ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота;
ТТХ – трифенилтетразолия хлорид;
ЦНС – центральная нервная система;
 AUC_{0-t} – площадь под кривой «концентрация-время» от нуля до последнего забора крови;
 C_{max} – максимальная концентрация при однократном введении;
G-per – глутатионпероксидаза;
HIF – huroxia inducible factor;
 K_{el} – константа элиминации;
Pgp – гликопротеин-P.