

МЫЛЬНИКОВ ПАВЕЛ ЮРЬЕВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА НА
ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р В
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОМ БАРЬЕРЕ В НОРМЕ И ПРИ ОСТРОЙ
ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

3.3.6 — фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Якушева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

И.о. ведущего научного сотрудника – заведующего лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии, заместителя заведующего отделом космической радиобиологии и фармакологии
ГНЦ РФ – ИМБП РАН,

доктор медицинских наук

Яснецов Виктор Владимирович

Преподаватель кафедры фармакологии
ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, доктор биологических наук,
доцент

Марышева Вера Васильевна

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

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.183.01, созданного на базе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8.

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор

Вальдман Елена Артуровна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, «Мексидол»[®]) — отечественный лекарственный препарат с антиоксидантной и антигипоксической активностью. В экспериментальных и клинических исследованиях ЭМГПС доказал свою высокую эффективность при широком спектре различных патологий (Воронина Т.А. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2012, Т. 112, №12, С. 86-90).

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) – АТФ-зависимый мембранный белок-транспортер, выводящий субстраты из клеток в межклеточное пространство и биологические жидкости и локализующийся в гистогематических барьерах (Lin J.H., Yamazaki M. Clinical pharmacokinetics, 2003, Т. 42, №1, С. 59-98).

Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) – редокс-чувствительный транскрипционный фактор, который реагирует на изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках. Его экспрессия повышается при развитии окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов (Kaspar J.W. et al. Free Radical Biology and Medicine, 2009, Т. 47, №9, С. 1304-1309).

HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) – основной транскрипционный фактор, обуславливающий долгосрочную адаптацию клеток к гипоксии. Он усиливает образование VEGF, эритропоэтина и ферментов гликолиза, стимулирует ангиогенез (Semenza G.L. et al. Oxygen Sensing, 2002, С. 123-130).

Ранее было установлено ингибирующее действие ЭМГПС на активность Pgp на организменном уровне, но его локальное влияние на ГЭБ не изучалось. Способность ЭМГПС ингибировать Pgp в ГЭБ может объяснять возможность потенцирования эффектов лекарственных препаратов-субстратов Pgp при комбинированной терапии неврологических заболеваний (Воронина Т.А., Иванова Е. А. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2019, Т. 119, №4, С. 115-124). Оценка влияния препарата на уровень транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α в условиях нормы и гипоксии может являться важным дополнением и уточнением механизма его действия.

Степень разработанности проблемы. ЭМГПС широко применяется в комплексной терапии различных заболеваний. Его механизм действия продолжает исследоваться (Воронина Т.А. Фарматека, 2009, Т. 6, С. 28-31; Воронина Т.А. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2020, Т. 120, №4, С. 81-87).

В течение последних 10 лет основным направлением работы кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России является исследование регуляции Pgr лекарственными препаратами разных фармакологических групп (Якушева Е.Н. и др. Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова, 2011, Т. 19, № 3, С. 142-148).

Nrf2 и HIF-1 α – транскрипционные факторы, играющие важную роль в адаптации клеток к окислительному стрессу и гипоксии соответственно (Kaspar J.W. et al. Free Radical Biology and Medicine, 2009, Т. 47, №9, С. 1304-1309; Semenza G.L. et al. Oxygen Sensing, 2002, С. 123-130). Показана способность некоторых веществ повышать экспрессию указанных факторов (Victor P. et al. European Journal of Pharmacology., 2020, С. 173395.; Yang T. et al. Experimental neurology, 2020, Т. 325, С. 113142).

В исследовании *in vivo* было показано, что ЭМГПС ингибирует активность Pgr на уровне целостного организма (Якушева Е. Н. и др. Экспериментальная и клиническая фармакология, 2015, Т. 78, №5, С. 19-23). Однако механизм данного эффекта не был изучен и требует уточнения в экспериментах *in vitro*.

В настоящий момент разработаны методики оценки функциональной активности Pgr на уровне целостного организма (Mohammadzadeh R. et al. Advanced pharmaceutical bulletin, 2014, Т. 4, №3, С. 219), однако работ, в которых оценивалась бы активность Pgr локально в ГЭБ, обнаружено не было.

Цель исследования – изучить влияние ЭМГПС на функционирование Pgr в ГЭБ и относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга крыс в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии.

Задачи исследования.

- 1) Исследовать влияние ЭМГПС на активность Pgr *in vitro*.

2) Разработать метод оценки активности Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс.

3) Изучить влияние ЭМГПС на активность и относительное количество Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга интактных крыс.

4) Исследовать влияние острой гипоксической гипобарической гипоксии и превентивного однократного введения ЭМГПС перед гипоксическим воздействием на функционирование Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс.

5) Оценить действие ЭМГПС на относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 в лобной доле коры головного мозга крыс в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии.

Научная новизна.

1) В эксперименте *in vitro* установлено, что ЭМГПС способен ингибировать активность Pgr.

2) Разработана методика оценки активности Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс, основанная на анализе фармакокинетики фексофенадина — маркерного субстрата белка-транспортера.

3) Выявлена способность ЭМГПС при однократном внутривенном введении в дозе 50 мг/кг ингибировать активность Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга интактных крыс.

4) Показано, что при острой гипоксической гипобарической гипоксии, соответствующей подъёму на высоту 8000 м с экспозицией 30 мин, происходит повышение относительного количества Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс, однако в то же время повышается проницаемость барьера.

5) Установлено, что однократное внутривенное введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг за 30 минут до гипоксического воздействия препятствует повышению относительного количества Pgr и не влияет на проницаемость ГЭБ в условиях острой гипоксической гипобарической гипоксии, соответствующей высоте 8000 м с экспозицией 30 мин.

б) Выявлено, что однократное внутрибрюшинное в дозе 120 мг/кг и курсовое пероральное в дозе 100 мг/кг 3 раза в день в течение 14 суток введение ЭМГПС интактным крысам не влияет на относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 в коре головного мозга.

7) Установлено, что превентивное курсовое внутривентрикулярное введение ЭМГПС в дозе 100 мг/кг 3 раза в день в течение 14 суток перед моделированием гипоксии препятствует повышению количества транскрипционного фактора HIF-1 α в коре головного мозга крыс, но увеличивает количество транскрипционного фактора Nrf2.

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе исследования установлено: ЭМГПС оказывает прямое ингибирующее действие на Pgp в ГЭБ крыс, что следует использовать для прогнозирования фармакокинетических межлекарственных взаимодействий. Показано, что ЭМГПС при гипоксии способствует увеличению уровня Nrf2, что может являться важным звеном в реализации антиоксидантного действия препарата. Был разработан метод оценки функциональной активности Pgp в ГЭБ, который может быть рекомендован для изучения особенностей фармакокинетики лекарственных веществ.

Методология и методы исследования. Исследование выполнено в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Влияние ЭМГПС на активность Pgp *in vitro* оценивалось на линии клеток Caco-2 по транспорту маркерного субстрата Pgp – фексофенадина – через билипидную мембрану клеток. Активность Pgp в ГЭБ в опытах *in vivo* анализировали по оригинальной запатентованной методике, заключающейся в оценке проникновения фексофенадина в головной мозг после его внутривенного введения. Концентрацию фексофенадина в опытах *in vitro* и *in vivo* определяли методом ВЭЖХ-УФ. Влияние ЭМГПС на относительное количество Pgp, а также транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α в коре больших полушарий головного мозга крыс, оценивали иммуногистохимически. Полученные данные обрабатывали адекватными статистическими методами.

Исследование соответствует пунктам 4, 8 и 14 паспорта специальности «3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология».

Положения, выносимые на защиту

1) ЭМГПС оказывает прямое ингибирующее влияние на функциональную активность Pgp в опытах *in vitro* на клетках линии Caco-2.

2) Разработан метод оценки активности Pgp в ГЭБ коры головного мозга крыс по анализу фармакокинетики фексофенадина – маркерного субстрата белка-транспортера.

3) Однократное внутривенное введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг ингибирует активность Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга в опытах *in vivo* на крысах Wistar.

4) Острая гипоксическая гипобарическая гипоксия вызывает повышение относительного количества Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс Wistar, но увеличивает проницаемость барьера. Однократное внутривенное введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг перед гипоксическим воздействием препятствует повышению относительного количества белка-транспортёра и не изменяет повышенную на фоне гипоксии проницаемость ГЭБ.

5) Однократное внутрибрюшинное введение в дозе 120 мг/кг и курсовое внутрижелудочное введение ЭМГПС в дозе 100 мг/кг 3 раза в день в течение 14 дней интактным крысам не влияет на относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 в коре головного мозга, а его профилактическое внутрижелудочное введение препятствует повышению уровня HIF-1 α и увеличивает относительное количество Nrf2 в коре головного мозга крыс при модели острой гипоксической гипобарической гипоксии.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием современного оборудования и адекватных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой в соответствии с общими рекомендациями по оценке активности Pgp (Решение совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 №65; Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014, 344 с.; *In vitro*

metabolism and transporter-mediated drug-drug interaction studies. Guidance for Industry, 2020).

Апробация результатов. Основные положения диссертации доложены, обсуждены и опубликованы в материалах: III Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2017); Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018); V Съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018); Всероссийской научной конференции с международным участием «Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции» (Рязань, 2019); XXIII Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2019); Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвящённой 70-летию основания вуза на Рязанской земле (Рязань, 2020).

Апробация работы состоялась 28 июня 2021 года на заседании кафедр фармакологии с курсом фармации ФДПО, нормальной физиологии с курсом психофизиологии, неврологии и нейрохирургии, биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, фармацевтической технологии, управления и экономики фармации, фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Внедрение результатов исследования в практику. Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов на кафедре фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, а также внедрены в практику ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно выполнен обзор литературы, разработана программа исследования, осуществлены опыты *in vitro* и *in vivo*, хроматографические исследования, обработка и интерпретация

результатов, подготовка публикаций по диссертационной работе. Личный вклад автора в выполнение диссертационной работы более 80%.

Связь задач исследования с основным планом научно-исследовательских работ университета. Работа выполнена в рамках плана НИР ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (регистрационный номер: №АААА-А18-118011040043-9) при частичной поддержке гранта РФФИ №16-44-620292 (регистрационный номер: №АААА-А16-116042010023-6).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 10 работ, из которых 3 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из которых 2 статьи в журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus. Получен 1 патент Российской Федерации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), результаты исследования (глава 3), обсуждение полученных результатов (глава 4), выводы, практические рекомендации, список литературы. Диссертация иллюстрирована 31 рисунком и 14 таблицами. Список литературы включает 246 источников, из них 66 источников отечественной и 180 зарубежной литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры клеток. Исследования *in vitro* выполнены на линии клеток Caco-2 (ФГБУН НИЦ РАН, Санкт-Петербург) (Elsby R. et al. Xenobiotica, 2008, Т. 38, №7-8, С. 1140-1164; In vitro metabolism and transporter-mediated drug-drug interaction studies. Guidance for Industry. 2017). Клетки культивировали в трансвелл-системе (Transwell) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 4500 мг/мл («ПанЭко», Россия), L-глутамина 4 mM («Sigma-Aldrich», Германия), эмбриональной бычьей сыворотки 15% («Sigma-Aldrich», Германия), пенициллина 100 ЕД/мл и стрептомицина 100 мкг/мл («ПанЭко», Россия) при температуре 37°C и содержании CO₂ 5% (Фрешни Р.Я. М. : Лаборатория знаний, 2018, 791 с.; Riede J. et al. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, Т. 132,

С. 132-141). В работе использовали 24-луночный планшет с диаметром мембраны 0,33 см и размером пор 0,4 мкм (24 mm Transwell®-COL, Collagen-Coated 0,4µm Pore PTFE Membrane Insert, Sterile, «Corning», США). Клетки культивировали 21 день. Начиная с 22 дня на клетках выполняли транспортные эксперименты при достижении трансэпителиального сопротивления выше 500 мОм*см² (Srinivasan B. et al. Journal of laboratory automation, 2015, Т. 20, №2, С. 107-126).

Активность P_{gr} оценивали по транспорту фексофенадина («Sigma-Aldrich», Германия). Для этого питательную среду заменяли на транспортную — раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ раствора Хепеса при pH=7,4 («Sigma-Aldrich», Германия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия). В апикальную камеру добавляли фексофенадин до 150 мкМ (Petri N. et al. Pharmaceutical research, 2004, Т. 21, №8, С. 1398-1404), через 1, 2, 3 ч забирали по 50 мкл образцов из базолатеральной камеры с целью определения концентрации в них фексофенадина ($a \rightarrow b$ перенос). Затем тестировали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную — $b \rightarrow a$ перенос. В данном случае субстрат добавляли в базолатеральную камеру с последующим забором образцов из апикальной камеры.

Транспорт фексофенадина между камерами a и b в обоих направлениях оценивали по формуле (Elsby R. et al. Xenobiotica, 2008, Т. 38, №7-8, С. 1140-1164):

$$P_{app} = \frac{dC \cdot V}{dt} \frac{1}{(A \cdot C_0)},$$

где P_{app} — коэффициент кажущейся проницаемости; dC/dt —

изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации; V — объём камеры реципиента; A — площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе, на которой культивировались клетки; C_0 — начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

В дальнейшем проводился расчёт отношения коэффициентов кажущейся проницаемости по формуле: Отношение коэффициентов = $\frac{P_{app\ b \rightarrow a}}{P_{app\ a \rightarrow b}}$; где $P_{app\ b \rightarrow a}$ — коэффициент кажущейся проницаемости при $b \rightarrow a$ переносе; $P_{app\ a \rightarrow b}$ — коэффициент кажущейся проницаемости при $a \rightarrow b$ переносе.

Для оценки влияния ЭМГПС (ООО НПК «Фармасофт», Россия) на активность P_{gr} *in vitro* его добавляли в обе камеры одновременно в концентрациях

1, 10, 50, 100, 200 мкмоль/л. Для сравнения использовался классический ингибитор P_{gp}, верапамил («Sigma-Aldrich», Германия), в аналогичных концентрациях. На каждый опыт было выполнено по 3 повторения (n=3). Оценивали $P_{app\ b\rightarrow a}$, $P_{app\ a\rightarrow b}$ и отношение $P_{app\ b\rightarrow a} / P_{app\ a\rightarrow b}$ для фексофенадина в присутствии тестируемых веществ.

Концентрацию фексофенадина определяли методом ВЭЖХ-УФ при длине волны 220 нм на хроматографической системе «Стайер» (Россия). При пробоподготовке 50 мкл транспортной среды разбавляли в 150 мкл подвижной фазы и 100 мкл полученного раствора анализировали. Условия хроматографирования: колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6мм) с зернением 4 мкм, температура разделения 35°C, скорость потока 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила («ACROS ORGANICS», Бельгия, «Для ВЭЖХ»), 267,4 мл воды деионизированной, 6,33 мл кислоты уксусной ледяной («ХИММЕД», Россия), триэтиламина («ACROS ORGANICS», Бельгия, «Для ВЭЖХ») — до pH=6,7. Время удерживания фексофенадина: 12,8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики: 1,2 – 57,4 мкМ. Хроматографическая методика была валидирована (FDA Guidance for Industry (draft guidance), 2020; Guideline on bioanalytical method validation. EMA, 2021).

Исследования *in vivo* выполнены на крысах-самцах Wistar массой 200-250 г, полученных из питомника «ООО КролИнфо» (Московская область, Орехово-Зуевский район, деревня Новая). Все животные были разделены на следующие серии:

I. Первая серия – разработка методики оценки активности P_{gp} в ГЭБ: животным 1 группы 1-кратно в/в вводили фексофенадин в дозе 5 мг/кг (n=30, по 5 животных на каждую временную точку), 2 группы – 10 мг/кг (n=30) (Jaisue S. et al., Xenobiotica, 2010, Т.40, №11, С. 743-750), 3 группы – 15 мг/кг (n=30). Через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после инъекции животных выводили из эксперимента.

II. Вторая серия – изучение влияния ЭМГПС на активность P_{gp} в ГЭБ: животным 1 группы 1-кратно в/в вводили ЭМГПС в дозе 50 мг/кг (n=30)

(Перфилова В.Н. и др. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015, Т. 78, №9, С. 8-12), 2 группы – верапамил в дозе 1,65 мг/кг (n=30) (Перфилова В.Н. и др., 2015), 3 группы – в течение 14 дней 2 р/д per os рифампицин в дозе 20 мг/кг (n=30) (Rana S.V. et al., Molecular and cellular biochemistry. 2006, Т. 289, №1, С. 39-47). В последующем у животных оценивали функционирование Pgr в ГЭБ.

III. Третья серия – изучение влияния ЭМГПС на относительное количество Pgr в ГЭБ. Перед оценкой относительного количества Pgr в ГЭБ животным 1 группы (n=5) вводили per os 3 р/д в течение 14 дней воду для инъекций, 2 группы (n=5) – однократно в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг, 3 группы (n=5) – per os ЭМГПС в дозе 100 мг/кг 3 р/д в течение 14 дней (Воронина Т.А. и др. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2006, Т. 69, №4, С. 6-9), 4 группы (n=5) – per os рифампицин в дозе 20 мг/кг 2 р/д в течение 14 дней.

IV. Четвертая серия – изучение влияния ЭМГПС на активность Pgr в ГЭБ при гипоксии. За 30 мин перед моделированием гипоксии с последующей через 3 часа оценкой функционирования Pgr в ГЭБ животным 1 группы (n=30) вводили 1-кратно в/в воду для инъекций, а 2 группы (n=30) – 1-кратно в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг.

V. Пятая серия – изучение влияния ЭМГПС на относительное количество Pgr в ГЭБ при гипоксии. За 30 мин перед моделированием гипоксии с последующей через 3 часа оценкой относительного количества Pgr в ГЭБ животным 1 группы (n=5) вводили 1-кратно в/в воду для инъекций, 2 группы (n=5) – 1-кратно в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг.

VI. Шестая серия – изучение влияния ЭМГПС на относительное количество транскрипционных факторов NIF-1 α и Nrf2 и выраженность окислительного стресса в коре головного мозга крыс. Перед оценкой данных показателей животным 1 группы перорально вводили воду для инъекций 3 р/д в течение 14 дней, 2 группы – перорально ЭМГПС в дозе 100 мг/кг 3 р/д в течение 14 дней, 3 группы – 1-кратно внутрибрюшинно ЭМГПС в дозе 120 мг/кг (Яснецов В.В. Воронина Т.А. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009. Т. 72, №1, С. 68-70), 4 группы – перорально воду для инъекций 3 р/д в течение 14 дней с

последующим моделированием гипоксии, 5 группы – перорально ЭМГПС в дозе 100 мг/кг 3 р/д в течение 14 дней с последующим моделированием гипоксии.

Гипоксию моделировали подъемом животных в барокамере на высоту 8000 м сроком на 30 мин (Бобков Ю.Г., Иванова И.А. Пат. физиол. и эксперим. терапия, 1987, №6, С. 13-19). Через 3 ч после моделирования гипоксии животных выводили из эксперимента.

Оценку активности Pgr в ГЭБ выполняли по оригинальной разработанной методике, основанной на определении степени проникновения фексофенадина в ткань мозга после в/в введения. После введения фексофенадина в дозе 10 мг/кг через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин у животных забирали 4 мл крови в гепаринизированные пробирки из брюшной аорты и кору больших полушарий головного мозга. Кровь центрифугировали при 1000 g 10 мин для получения плазмы. Образцы тканей и плазмы замораживали при -29°C до последующего анализа. Количество фексофенадина в образцах определяли методом ВЭЖХ-УФ при составе подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила, 267,4 мл воды деионизированной, 7,0 мл триэтиламина, 4,66 мл кислоты уксусной ледяной, pH=6,0. Скорость потока: 1 мл/мин. Время удерживания фексофенадина: 14,91±0,25 мин. Коэффициенты экстракции фексофенадина: из плазмы крови – 83,57%, из гомогената коры головного мозга – 81,25%. Предел количественного определения и предел обнаружения фексофенадина в плазме крови равны соответственно 100 нг/мл и 11,68 нг/мл, а в гомогенате мозга — соответственно 50 нг/г и 35,27 нг/г. Суммарное количество фексофенадина, попавшего в системный кровоток и в кору больших полушарий, оценивали по показателям AUC_{0-t} плазма и AUC_{0-t} мозг (Каркищенко И.И. и др., Фармакокинетика. Ростов-на-Дону: Феникс, 2001, 284 с.). Для оценки проницаемости ГЭБ был рассчитан показатель $AUC_{0-t-мозг} / AUC_{0-t-плазма}$ (Di L. et al. Expert opinion on drug discovery, 2008, Т.3, №6, С. 677-687).

Относительное количество Pgr в ГЭБ и транскрипционных факторов Nfr2 и HIF-1 α в коре больших полушарий головного мозга оценивали иммуногистохимически. Животных выводили из эксперимента введением летальной дозы (30 мг/кг) золетила («Золетил 100», «Virbac С.А.», Франция). После

стандартной обработки полученных срезов головного мозга их инкубировали с первичными антителами к Pgp («SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC», США) в разведении 1:50, или антителами к Nrf2 (Biorbyt orb11165) в разведении 1:50, или антителами к HIF-1 α (HIF1A / HIF1 Alpha (aa432-528) (Unconjugated) (H1alpha67) (LifeSpan LS-B110)). Для выявления первичных антител использовали вторичные антитела, конъюгированные с полимером, сцепленным с пероксидазой. В качестве хромогена использовали 0,1% раствор 3,3-диаминобензидина тетрахлорида с добавлением 0,05% раствора пероксида водорода («Дакон», Дания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином (Kumar G.L., Rudbeck L. Immunohistochemical methods // Пер. с англ. под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова, М.: 2011, 224 с.). Микропрепараты фотографировали цифровой камерой ЛОМО ТС-500 (Россия) при увеличении в 400 раз. С каждого микропрепарата фотографировали 10 участков. Анализ изображения осуществляли программой ImageJ (США). С помощью плагина Colour Deconvolution изображение разделяли на слой, окрашенный диаминобензидином, и слой, окрашенный гематоксилином (Fuhrich, D.G. et al. Anal. Quant. Cytopathol. Histopathol, 2013, Т. 35, №4, С. 210–216). Относительное количество Pgp анализировали по площади иммунопозитивных мембран с помощью модуля Analyze Particles. Количество ядер и их площадь, окрашенных гематоксилином, а также имеющих положительную реакцию с антителами к Nrf2 и HIF-1 α , оценивали с помощью модуля Analyze Particles. Затем рассчитывали относительное количество иммунопозитивных ядер в поле зрения по формуле:

$$Q_{\text{отн}} = \frac{Q_{\text{и+}}}{Q_{\text{ог}}} * 100\%,$$

где $Q_{\text{отн}}$ – относительное количество иммунопозитивных ядер, $Q_{\text{и+}}$ - количество иммунопозитивных ядер, $Q_{\text{ог}}$ – общее количество ядер, окрашенных гематоксилином. По аналогичной формуле рассчитывали относительную площадь иммунопозитивных ядер.

Для оценки выраженности окислительного стресса в коре головного мозга крыс, образец гомогенизировали при +2 °С в 0,05 М изотоническом фосфатном буфере с рН=7,4, с использованием гомогенизатора DІАХ 900 (насадка 6G) при 24000 об/мин в течение 60 сек. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин 10

минут ($T = +2^{\circ}\text{C}$). В полученном супернатанте определяли концентрацию малонового диальдегида по методу R. Hoss в модификации Н.Д. Стальной и Т.Г. Горишвили, небелковых тиоловых (SH) групп – по реакции восстановления дисульфид-5,5-дитиобис-2-нитробензоата (Ellman G.L. 1959), активность Se-зависимой глутатионпероксидазы (G-per) – по уменьшению концентрации НАДФ*Н₂ в сопряжённой системе (Ланкин В.З., 1976), глутатион-S-трансферазы (G-tr) – по реакции конъюгации глутатиона с 1-хлор-2,4-динитрохлорбензолом (Keen J.H., 1976).

Полученные результаты обрабатывали в программах «StatSoft Statistica 13.0» и «Microsoft Office Excel» 2017. Распределение данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения данных использовался дисперсионный анализ (ANOVA); попарные сравнения выполняли по критерию Ньюмана-Кейлса. При другом распределении данных использовался критерий Крускала-Уоллиса для несвязанных выборок. Попарные сравнения выполняли по критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Полученные результаты заносились в таблицы и графики в соответствующем распределению данных виде (С. Гланц. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ., М., Практика, 1998, 459 с.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ЭМГПС на активность Pgp *in vitro*. В интактных клетках Caco-2 значение коэффициента $P_{app\ b \rightarrow a}$ составило $2,97 \cdot 10^{-6} \pm 1,32 \cdot 10^{-6}$ см/сек, $P_{app\ a \rightarrow b} = 0,61 \cdot 10^{-6} \pm 0,21 \cdot 10^{-6}$ см/сек, а их отношение $P_{app\ b \rightarrow a} / P_{app\ a \rightarrow b} = 4,73 \pm 1,04$. Значение $P_{app\ b \rightarrow a} / P_{app\ a \rightarrow b}$, превышающее «2», свидетельствует об асимметрии транспорта фексофенадина через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 и подтверждает адекватность используемой методики.

В ходе исследования было показано, что классический ингибитор Pgp верапамил в концентрациях 100 и 200 мкмоль/л снижал показатель $P_{app\ b \rightarrow a} / P_{app\ a \rightarrow b}$ по сравнению с показателями контроля ($p = 0,038$ и $p = 0,017$ соответственно), что свидетельствует об ингибировании активности белка-транспортера.

Показатель $P_{app\ b\rightarrow a}/P_{app\ a\rightarrow b}$ фексофенадина уменьшался при использовании ЭМГПС в концентрациях 100 ($p=0,026$) и 200 мкмоль/л ($p=0,002$) по сравнению с контролем, что свидетельствуют о снижении активности белка-транспортера Pgp данным препаратом. При расчете IC_{50} и оценке динамики изменения $P_{app\ b\rightarrow a}/P_{app\ a\rightarrow b}$ фексофенадина было показано, что данные параметры достоверно не различались при применении ЭМГПС и верапамила ($p>0,05$) (рисунок 1).

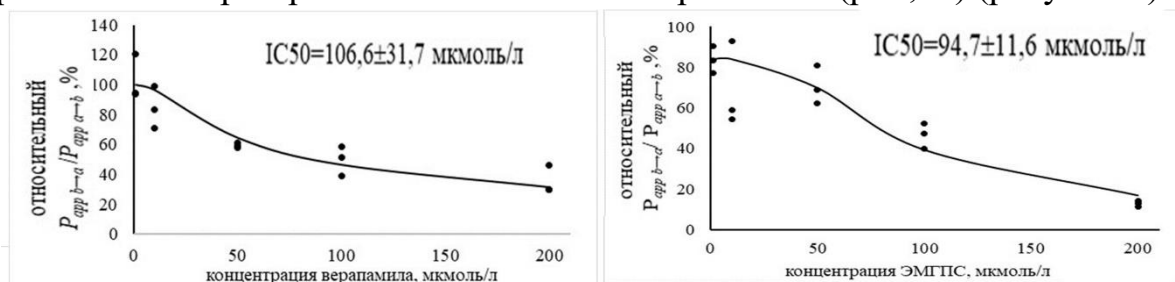


Рисунок 1. Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a}/P_{app\ a\rightarrow b}$ фексофенадина под действием верапамила и ЭМГПС.

Таким образом, в опытах *in vitro* на клетках линии Сасо-2 показано, что ЭМГПС является прямым ингибитором Pgp и по своей активности сопоставим с классическим ингибитором белка-транспортера – верапамилем.

Методика оценки активности Pgp в ГЭБ. Для оценки активности Pgp в ГЭБ головного мозга крыс раствор фексофенадина вводили в хвостовую вену в дозах 5, 10 и 15 мг/кг массы тела и через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин животных подвергали эвтаназии с последующим забором биоматериала.

Для экстракции фексофенадина из плазмы крови к 1,5 мл образца прибавляли 4 мл ацетонитрила («ACROS ORGANICS», Бельгия), встряхивали на приборе Shaker при 400 об/мин 15 мин и центрифугировали 15 мин при 1500 g. Затем упаривали надосадочную жидкость при 50°C на роторно-вакуумном испарителе. Сухой остаток растворяли в 300 мкл подвижной фазы с использованием встряхивателя Vortex («Heidolph», Германия). Подготовку образца коры головного мозга осуществляли следующим способом: к 500 мг образца добавляли 500 мкл воды деионизированной и гомогенизировали в течение 1 мин, после чего добавляли 4 мл ацетонитрила и встряхивали 15 мин; затем центрифугировали при 1750 g 15 мин, надосадов упаривали на роторно-вакуумном испарителе, затем растворяли в 300 мкл подвижной фазы с помощью вибротриггера и повторно

центрифугировали при 1750 g 5 мин. Надосадочную жидкость анализировали. Концентрацию фексофенадина в пробах определяли методом ВЭЖХ-УФ. Методика была валидирована согласно современным рекомендациям.

Оптимальной была признана доза фексофенадина 10 мг/кг массы тела, поскольку при концентрации 5 мг/кг во многих временных точках концентрация в гомогенате коры головного мозга была ниже предела количественного определения, а при дозе 15 мг/кг концентрация в плазме крови в некоторых точках была слишком высокой и требовала разведения перед анализом (рисунок 2).

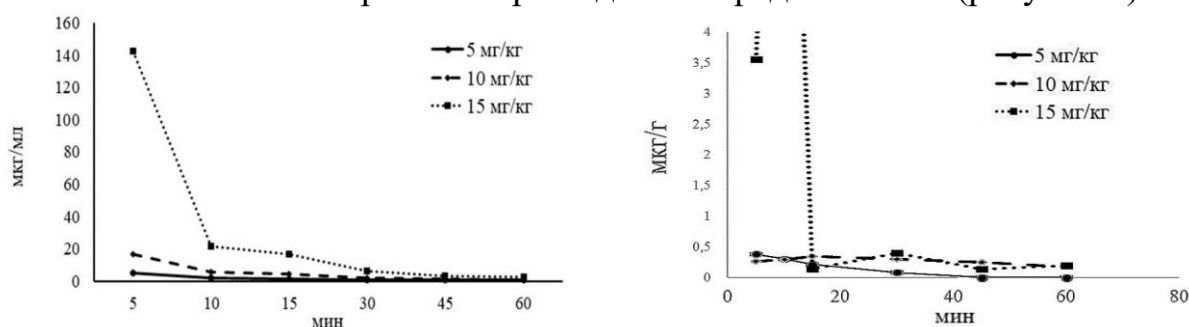


Рисунок 2. Динамика концентраций фексофенадина в плазме крови (слева) и гомогенате коры головного мозга (справа) после его внутривенного введения в дозах 5, 10 и 15 мг/кг (n=5 на каждую временную точку)

Для оценки функциональной активности Pgp в ГЭБ по полученным значениям концентраций строили фармакокинетические кривые, определяли значения $AUC_{0-t(\text{плазма})}$ и $AUC_{0-t(\text{мозг})}$, а затем рассчитывали показатель $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$, отражающий проницаемость ГЭБ для субстрата Pgp.

Влияние ЭМГПС на активность Pgp в ГЭБ. Перед определением активности Pgp в ГЭБ ЭМГПС вводили животным 1-кратно в/в в дозе 50 мг/кг. Для сравнения использовали классический индуктор Pgp, рифампицин, вводимый внутрижелудочно в дозе 20 мг/кг в течение 14 суток, и классический ингибитор Pgp, верапамил, который вводили 1-кратно в/в в дозе 1,65 мг/кг массы тела.

Введение ЭМГПС, рифампицина и верапамила существенно не влияло на концентрацию фексофенадина в плазме крови крыс и $AUC_{0-t(\text{плазма})}$ после его внутривенного введения: данные показатели статистически значимо не отличались от значений контроля. Применение рифампицина в течение 14 суток приводило к

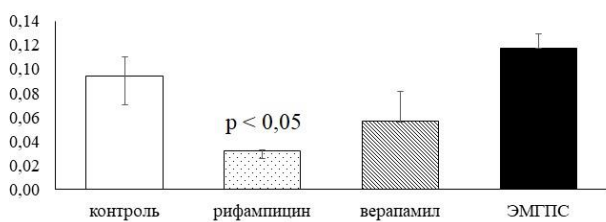


Рисунок 3. Изменение $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ фексофенадина при использовании рифампицина, верапамила и ЭМГПС (медиана, верхний и нижний квартили).

$AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ (р<0,05) (рисунок 3) по сравнению с контролем, что подтверждает адекватность используемой методики исследования. Введение верапамила не оказало существенного влияния на концентрацию фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга. Предположительно это связано с гипоперфузией мозга из-за снижения систолического АД.

1-кратное в/в введение ЭМГПС вызывало повышение концентрации фексофенадина в коре больших полушарий, увеличивало $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ (р<0,05) и отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ фексофенадина (р=0,06; рисунок 3) по сравнению с показателями контроля.

Таким образом, 1-кратное в/в введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы снижает активность белка-транспортера Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс.

Влияние ЭМГПС на относительное количество Pgp в ГЭБ. Относительное количество Pgp в ГЭБ коры головного мозга крыс определяли иммуногистохимически.

Курсовое введение рифампицина в течение 14 суток приводило к повышению относительной площади Pgp позитивных мембран на 70,5% (р=0,008) по сравнению с показателями контрольных животных. При этом ни 1-кратное в/в введение в дозе 50 мг/кг массы тела, ни курсовое внутрижелудочное в течение 14 суток в дозе 100 мг/кг массы тела введение ЭМГПС не оказывали достоверного эффекта на относительное количество Pgp в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс (рисунок 4).

снижению концентрации фексофенадина в коре головного мозга крыс по сравнению с показателями контрольных животных. После введения рифампицина также происходило снижение $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ (р<0,05) и отношения

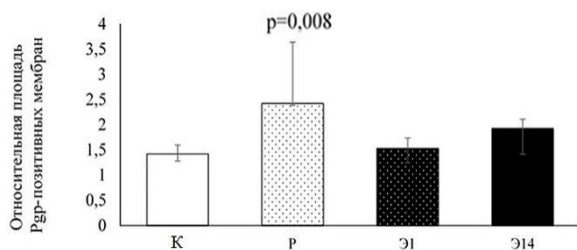


Рисунок 4. Изменение относительного количества Pgr в ГЭБ при использовании рифампицина и ЭМГПС (медиана, верхний и нижний квартили)

Примечание: К – контроль; Р – рифампицин в дозе 20 мг/кг, 1 р/д, 14 дней; Э1 – в/в введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг, 1-кратно; Э14 – внутрижелудочное введение ЭМГПС в дозе 100 мг/кг, 3 р/д, 14 суток

относительно показателей контроля ($p > 0,05$). В то же время концентрация в гомогенате коры мозга ($p < 0,05$ через 5, 45 и 60 мин), $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ ($p = 0,003$) и отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ ($p = 0,027$) фексофенадина после гипоксического воздействия превосходили показатели контрольных животных, что свидетельствует о повышении проникновения фексофенадина в кору головного мозга крыс после моделирования гипоксии.

Превентивное однократное внутривенное введение ЭМГПС перед гипоксическим воздействием приводило к следующим изменениям: концентрация фексофенадина в плазме крови превосходила значение контроля только на 60 мин ($p = 0,018$), при этом $AUC_{0-t(\text{плазма})}$ фексофенадина превышала аналогичный показатель контроля ($p = 0,011$). Концентрация в гомогенате коры мозга ($p < 0,05$), $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ ($p = 0,003$), отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ ($p = 0,032$) фексофенадина превосходили показатели контроля и были сопоставимы с данными серии гипоксии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что превентивное 1-кратное в/в введение ЭМГПС перед гипоксией не оказывает существенного влияния на проницаемость ГЭБ для фексофенадина.

При изучении влияния гипоксии и превентивного однократного внутривенного введения ЭМГПС перед гипоксическим воздействием на относительное количество Pgr в ГЭБ выявлено, что моделирование гипоксии приводило к повышению относительной площади Pgr-положительных мембран по

Таким образом, показано, что у интактных животных ЭМГПС не влияет на относительное количество Pgr в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс.

Влияние ЭМГПС на активность и относительное количество Pgr в ГЭБ при гипоксии. Моделирование гипоксии не приводило к достоверному изменению уровня фексофенадина в плазме крови

сравнению с контролем, а введение ЭМГПС перед моделированием гипоксии нивелировало индуцирующее действие дефицита кислорода на уровень Pgp (рисунок 5).

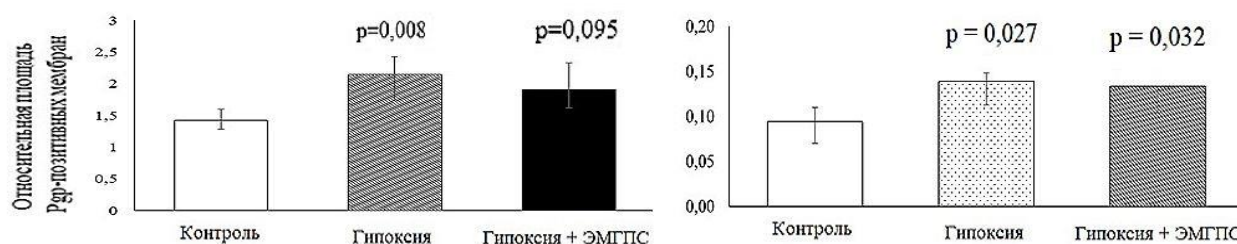


Рисунок 5. Изменение относительной площади Pgp-позитивных мембран в ГЭБ головного мозга крыс (слева) и изменение $AUC_{0-t(мозг)} / AUC_{0-t(плазма)}$ фексофенадина после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг (справа)

Примечание: * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями животных группы контроля

Таким образом, показано, что при гипоксии увеличивается относительное количество Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс, однако поступление фексофенадина в ткань мозга увеличивается, что скорее всего связано с повышением проницаемости ГЭБ. Однократное введение ЭМГПС перед гипоксическим воздействием препятствует повышению относительного количества Pgp в ГЭБ, но существенно не влияет на проницаемость субстрата белка-транспортера, которая остаётся значительно выше контроля.

Влияние ЭМГПС на транскрипционные факторы HIF-1 α и Nrf2 и оксидативный статус коры больших полушарий головного мозга крыс. Ни 1-кратное внутривенное введение, ни курсовое пероральное использование ЭМГПС в течение 14 дней не влияли на количество и относительную площадь HIF-1 α -позитивных ядер (рисунок 6) и Nrf2-позитивных ядер (рисунок 7) в коре головного мозга, а также на свободнорадикальный статус ткани мозга (рисунок 8), что свидетельствуют об отсутствии воздействия ЭМГПС на данные показатели у интактных животных.

Моделирование гипоксии приводило к увеличению относительной площади HIF-1 α - ($p=0,032$) и Nrf2-позитивных ядер ($p=0,056$) клеток коры головного мозга крыс. Количество таких ядер статистически значимо от контроля не отличалось. Происходило повышение уровня ТБК-реактивных продуктов ($p=0,052$) и снижение активности G-per ($p=0,004$) в гомогенате мозга по сравнению

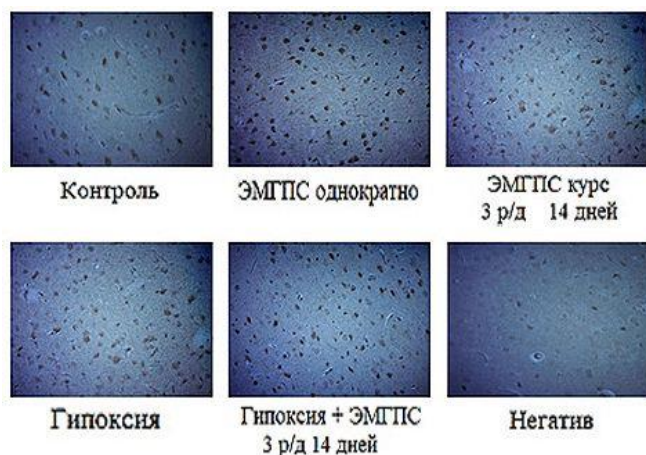


Рисунок 6. HIF-1 α -позитивные ядра клеток в коре лобной доли больших полушарий головного мозга крыс разных серий, увеличение x400. Примечание: негатив – окраска без первичных антител к HIF-1 α

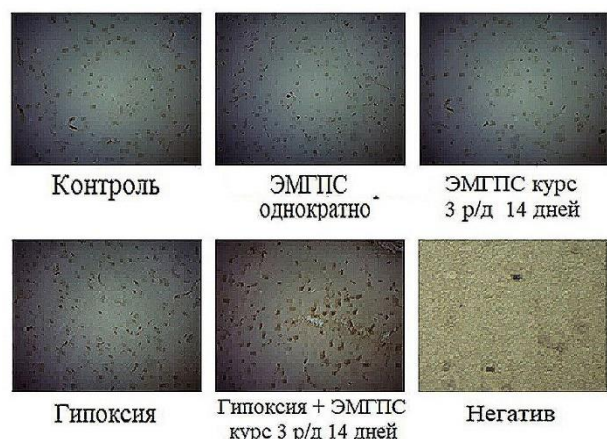


Рисунок 7. Nrf2 – позитивные ядра клеток в коре лобной доли больших полушарий головного мозга крыс разных серий, увеличение x400. Примечание: негатив – окраска без первичных антител к Nrf2

группы контроля ($p=0,032$), и группы гипоксии ($p=0,016$). Относительная площадь Nrf2-позитивных ядер превышала только показатели интактных животных ($p=0,008$). Превентивное введение ЭМГПС перед моделированием гипоксии

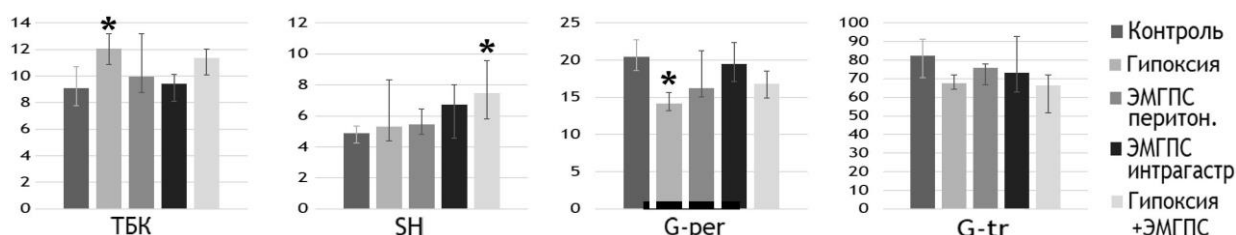


Рисунок 8. Параметры свободнорадикального статуса гомогената коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс. Примечание: * - достоверные различия с группой контроля ($p < 0,05$)

с показателями интактных животных. Данные изменения свидетельствуют о развитии оксидативного стресса, увеличении относительного количества транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 в ткани коры головного мозга при гипоксии.

Превентивное внутрижелудочное введение ЭМГПС в дозе 100 мг/мл 3 раза в день в течение 14 дней до гипоксического воздействия приводило к следующим результатам. Количество HIF-1 α -позитивных ядер в коре лобной доли головного мозга крыс, а также их относительная площадь статистически значимо не отличались от показателей интактных животных и группы гипоксии. В то же время количество Nrf2-позитивных ядер у крыс, которым осуществляли курсовое введение ЭМГПС, превышало показатели и

препятствовало увеличению уровня ТБК-реактивных продуктов, снижению активности G-per и повышало концентрацию небелковых SH-групп ($p=0,017$) в гомогенате мозга.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что курсовой профилактический приём ЭМГПС улучшает оксидативный статус ткани коры головного мозга, препятствует повышению уровня HIF-1 α и способствует увеличению относительного количества Nrf2 при острой гипоксической гипобарической гипоксии.

ВЫВОДЫ.

1. В опытах *in vitro* на клетках линии Caco-2 этилметилгидроксипиридина сукцинат в концентрациях 100 и 200 мкмоль/л ингибирует активность гликопротеина-P. Препарат является прямым ингибитором белка-транспортёра и по своей активности сопоставим с верапамилом.

2. Разработан метод оценки активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере, заключающийся во внутривенном введении субстрата белка-транспортёра — фексофенадина — в дозе 10 мг/кг массы тела с последующей оценкой в динамике его содержания в ткани коры лобных долей больших полушарий головного мозга крыс Wistar и расчётом показателя $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$.

3. В опытах *in vivo* на интактных крысах Wistar установлено, что однократное внутривенное введение этилметилгидроксипиридина сукцината в дозе 50 мг/кг массы тела ингибирует активность гликопротеина-P и не влияет на его относительное количество в гематоэнцефалическом барьере коры лобных долей больших полушарий головного мозга.

4. У крыс Wistar моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии, соответствующей нахождению на высоте 8000 м, приводит к повышению относительного количества гликопротеина-P и проницаемости гематоэнцефалического барьера для фексофенадина. Однократное внутривенное введение этилметилгидроксипиридина сукцината в дозе 50 мг/кг перед

моделированием гипоксии препятствует повышению относительного количества гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере коры больших полушарий головного мозга крыс и не увеличивает проницаемость гематоэнцефалического барьера для фексофенадина дополнительно к воздействию гипоксии.

5. Однократное внутрибрюшинное (в дозе 120 мг/кг) и курсовое внутрижелудочное введение (в дозе 100 мг/кг 3 раза в день в течение 14 дней) этилметилгидроксипиридина сукцината интактным крысам не влияет на относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 в коре головного мозга крыс. Курсовое внутрижелудочное введение этилметилгидроксипиридина сукцината в дозе 100 мг/кг 3 раза в день в течение 14 дней перед моделированием острой гипоксической гипобарической гипоксии препятствует повышению образования HIF-1 α и увеличивает относительное количество транскрипционного фактора Nrf2 в коре головного мозга крыс.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанный метод оценки активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере рекомендуется использовать для анализа локального влияния лекарственных веществ на данный белок-транспортёр. Полученные сведения об ингибирующем влиянии этилметилгидроксипиридина сукцината на активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере рекомендуется использовать с целью прогнозирования нежелательных межлекарственных взаимодействий в клинической практике.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC0-t(мозг) - площадь под кривой «концентрация в мозге-время»
AUC0-t(плазма) - площадь под кривой «концентрация в плазме крови-время»
G-per – глутатионпероксидаза
GSH – глутатион
G-tr – глутатион-S-трансфераза
HIF-1 – фактор 1, индуцируемый гипоксией
IC50 – концентрация, ингибирующая активность Pgp на 50%
Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор
Pgp – гликопротеин-Р

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
T1/2 – период полувыведения
АТФ – аденозинтрифосфат
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
НАДФ*Н2 – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
УФ-детектирование – ультрафиолетовое детектирование
ЦНС – центральная нервная система
ЭМГПС – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях:

1. Якушева Е.Н. Влияние мексидола на экспрессию фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1 α , в коре больших полушарий головного мозга крыс при ишемии [текст]/Е.Н. Якушева, **П.Ю. Мыльников**, И.В. Черных, А.В. Щулькин // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова**. – 2017. – Т. 117, № 10. – С. 87-91.
2. Якушева Е.Н. Влияние мексидола на экспрессию транскрипционного фактора Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга при экспериментальной ишемии [текст]/Е.Н. Якушева, **П.Ю. Мыльников**, И.В. Черных, А.В. Щулькин // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова**. – 2018. – Т. 118, № 5. – С. 64-68.
3. Черных И.В. Метод анализа функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере [текст] / 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.

Патент:

1. Способ оценки функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере // Патент России №RU 2677286 С1. 2019 / Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Попова Н.М., **Мыльников П.Ю.**

Публикации в материалах конференции:

1. **Мыльников П.Ю.** Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на экспрессию HIF-1 α и оксидативный статус лобной коры головного мозга в условиях патологии [текст] / **П.Ю. Мыльников**, Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин // **Материалы III Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» 14-15 сентября 2017 г., Рязань.** – Рязань: ООП УИТТиОП. – 2017. – С. 160-162.
2. Черных И.В. Ингибирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере как метод повышения эффективности фармакотерапии острого нарушения мозгового кровообращения [текст] / **П.Ю. Мыльников**, Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин. // **Материалы Всероссийской научной конференции молодых учёных, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки» 8-10 ноября 2018 г., Рязань.** – Рязань: ОТСиОП РязГМУ. – 2018. – С. 105-106.
3. **Мыльников П.Ю.** Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на экспрессию HIF-1 α в головном мозге крыс [текст] / **П.Ю. Мыльников**, Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин. // **Материалы Всероссийской научной конференции молодых учёных, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки» 8-10 ноября 2018 г., Рязань.** – Рязань: ОТСиОП РязГМУ. – 2018. – С. 80-81.
4. Черных И.В. Методика анализа функциональной активности ABCB1-белка в гематоэнцефалическом барьере [текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, **П.Ю. Мыльников**, М.В. Гацанога, Е.Н. Якушева, А.С. Есенина, М.М. Градинарь. // **Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Биология в высшей школе: актуальные вопросы науки, образования и междисциплинарной интеграции» 11-12 апреля 2019 г., Рязань.** – Рязань: ОТСиОП. – 2019 г. – С. 98-100.
5. **Мыльников П.Ю.** Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функциональную активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере крыс при гипоксии [текст] / **П.Ю. Мыльников**, Е.Н. Якушева // **Материалы ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвящённой 70-летию основания вуза на Рязанской земле 18 декабря 2020 г., Рязань.** – Рязань, 2020 г. – С. 123-125.
6. Щулькин А.В. Влияние отечественных нейротропиков на активность и экспрессию белка-транспортера Р-гликопротеина [текст] / А.В. Щулькин, Н.С. Косицына, И.В. Черных, **П.Ю. Мыльников**, Е.Н. Якушева // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2018. – Т. 17, № 5. – С. 87.