

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РЯЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА И. П. ПАВЛОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Елена Николаевна Якушева

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Функционирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере.....	13
1.1.1. Строение гематоэнцефалического барьера.....	13
1.1.2. Транспорт веществ через гематоэнцефалический барьер.....	20
1.1.3. Строение и локализация гликопротеина-Р	23
1.2. Фармакокинетика и фармакодинамика этилметилгидроксипиридина сукцината в организме человека и животных	27
1.2.1. Фармакокинетика этилметилгидроксипиридина сукцината	27
1.2.2. Фармакодинамика этилметилгидроксипиридина сукцината	28
1.3. Гипоксия как типовой патологический процесс	30
1.3.1. Молекулярные механизмы развития гипоксии	30
1.3.2. Роль окислительного стресса в патогенезе гипоксии	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1. Исследования <i>in vitro</i>	39
2.1.1. Клеточная линия.....	39
2.1.2. Определение активности гликопротеина-Р <i>in vitro</i>	39
2.1.3. Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность гликопротеина-Р <i>in vitro</i>	41
2.1.4. Определение концентрации фексофенадина в транспортной среде	41
2.2. Исследования <i>in vivo</i>	44
2.2.1. Тест-система.....	44
2.2.2. Дизайн исследования	45
2.2.3. Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии у крыс Wistar	48

2.2.4. Метод оценки активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере коры больших полушарий головного мозга крыс	48
2.2.5. Метод оценки относительного количества гликопротеина-Р, транскрипционных факторов Nrf2, HIF-1 α в коре больших полушарий головного мозга	49
2.2.6. Оценка выраженности окислительного стресса	51
2.2.7. Статистическая обработка полученных результатов	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	53
3.1. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на активность гликопротеина-Р <i>in vitro</i>	53
3.2. Разработка методики оценки активности гликопротеина-Р в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс	57
3.3. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере коры больших полушарий головного мозга крыс	69
3.4. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на относительное количество гликопротеина-Р в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс	74
3.5. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на активность и относительное количество гликопротеина-Р в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс в условиях гипоксии	76
3.6. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 и окислительный статус в лобной коре больших полушарий головного мозга крыс в норме и при гипоксии	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	95
ВЫВОДЫ	105

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	107
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	110

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, «Мексидол»[®]) – оригинальный отечественный лекарственный препарат, обладающий выраженной антиоксидантной и антигипоксической активностью. В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях ЭМГПС доказал свою высокую эффективность при широком спектре неврологических (острое и хроническое нарушение мозгового кровообращения, тревога, когнитивные нарушения), кардиологических (стенокардия напряжения, хроническая сердечная недостаточность, острое нарушение коронарного кровообращения), хирургических и инфекционных патологий [11]. Механизм действия ЭМГПС в настоящее время продолжает активно изучаться.

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) – АТФ-зависимый мембранный белок-транспортер, обеспечивающий выведение субстратов из клеток в межклеточное пространство и биологические жидкости [160]. Локализуясь в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), Pgp препятствует проникновению эндо- и ксенобиотиков в головной мозг, таким образом защищая его от их воздействия [211].

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. В частности, данный транскрипционный фактор стимулирует образование антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы), синтез глутатиона, ферментов детоксикации ксенобиотиков [143].

HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) – основной транскрипционный фактор, обуславливающий долгосрочную адаптацию клеток к гипоксии. Он усиливает образование VEGF (vascular endothelial growth factor), эритропоэтина и ферментов гликолиза, стимулирует ангиогенез [215].

Ранее было установлено ингибирующее действие ЭМГПС на активность Pgp на организменном уровне, однако локальное влияние препарата на функционирование белка-транспортёра в ГЭБ не изучалось. Способность ЭМГПС ингибировать Pgp в ГЭБ может объяснять возможность увеличения проникновения субстратов белка-транспортера в головной мозг и лежать в основе потенцирования эффекта при проведении комбинированной терапии, что было отмечено ранее проведёнными исследованиями [1; 9]. 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.

Настоящее исследование было посвящено изучению данных аспектов действия ЭМГПС.

Степень разработанности проблемы

ЭМГПС как препарат с антиоксидантным и антигипоксическим действием широко применяется в комплексной терапии различных заболеваний [10, 11]. Учитывая многообразие его фармакологических эффектов, можно предположить, что ЭМГПС имеет мультитаргетный и комплексный механизм действия, который продолжает исследоваться [6; 7].

На кафедре фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России более 10 лет в опытах *in vitro* и *in vivo* изучаются механизмы регуляции функционирования Pgp, а также анализируется принадлежность лекарственных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам данного белка-транспортера [48; 55; 60; 62; 64; 59].

Nrf2 и HIF-1 α – транскрипционные факторы, играющие важную роль в адаптации клеток к окислительному стрессу и гипоксии соответственно [143; 215]. Показана способность некоторых веществ (дефероксамин, куркумин) повышать экспрессию указанных факторов, что сопровождается развитием резистентности клеток к гипоксическим воздействиям [43; 236; 242]. Учитывая основные фармакологические эффекты ЭМГПС, целесообразно оценить его влияние на Nrf2 и HIF-1 α как фармакологические мишени.

В исследовании *in vivo* на кроликах породы советская шиншилла было показано, что ЭМГПС ингибирует активность Pgr на уровне целостного организма [62]. 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 [63; 175], однако работ, в которых оценивалась бы активность данного белка-транспортера 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

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 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

В ходе выполнения работы впервые:

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

2) Разработана методика оценки активности Pgp 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 Pgp 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 Pgp 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 Pgp и не влияет на проницаемость ГЭБ в условиях острой гипоксической гипобарической гипоксии, соответствующей высоте 8000 м с экспозицией 30 мин.

6) 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 внутрижелудочное 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 настоящего исследования установлено, что ЭМГПС ингибирует активность Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс, причем данный эффект обусловлен его прямым действием на молекулу белка-транспортера. Ингибирующее действие ЭМГПС может быть использовано для повышения проникновения субстратов Pgp в мозг при их совместном назначении, что позволит как разработать более эффективные схемы лечения, так и избежать потенциально опасных взаимодействий.

Выявлено, что острая гипоксическая гипобарическая гипоксия повышает количество Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс, но при этом возрастает проницаемость барьера (предположительно вследствие повреждения), что нивелирует защитную роль данного белка-транспортёра в ГЭБ в условиях дефицита кислорода.

Показано, что ЭМГПС в условиях нормоксии не влияет на относительное количество транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α , однако при гипоксии способствует увеличению уровня Nrf2, что может являться важным звеном в реализации антиоксидантного действия изучаемого препарата.

В ходе данного исследования также разработан метод оценки функциональной активности Pgp в ГЭБ, который может быть использован при изучении фармакокинетики лекарственных веществ, а также для прогнозирования вероятных межлекарственных взаимодействий.

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 белка-транспортера – фексофенадина – через билипидную мембрану клеток.

Активность Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс в опытах *in vivo* анализировали по оригинальной запатентованной методике, заключающейся в оценке проникновения фексофенадина в головной мозг после его внутривенного введения [42]. Данная методика была валидирована с

использованием классических индуктора и ингибитора исследуемого белка-транспортёра.

Концентрацию фексофенадина в опытах *in vitro* и *in vivo* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием.

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-транспортёра.

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 белка-транспортера Pgp [27; 35; 133].

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).

Сведения о публикациях по теме диссертации

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, 6 тезисов в материалах научных конференций. 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 источника, из них 66 источников отечественной и 180 зарубежной литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Функционирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере

1.1.1. Строение гематоэнцефалического барьера

Центральная нервная система защищена от ксено- и эндобиотиков, циркулирующих в крови, двумя барьерами: гематоэнцефалическим (ГЭБ) и гематоликворным (ГЛБ), которые избирательно ограничивают прохождение веществ [156].

ГЭБ локализуется на всех уровнях церебрального сосудистого дерева, а ГЛБ расположен в хориоидальных сплетениях внутри желудочковой системы головного мозга, отделяя интерстициальную жидкость мозга и спинномозговую жидкость от системного кровотока [184].

Термин «гематоэнцефалический барьер» впервые был введен М. Левандовским в 1900 году, когда он продемонстрировал, что нейротоксические агенты влияют на функцию мозга только при непосредственном введении в мозг, но не при введении в системный кровоток [120].

Однако, первое экспериментальное наблюдение барьера между мозгом и системным кровообращением было сделано раньше в 80-х годах XIX века П. Эрлихом и его коллегой Е. Гольдманном [120].

Эрлих заметил, что красители (такие как трипановый синий) после системного введения окрашивают все органы, за исключением головного и спинного мозга. Им была высказана гипотеза о том, что в центральной нервной системе (ЦНС) отсутствуют лекарственные рецепторы, присутствующие в периферических органах и тканях, которые связывают краситель. В 1913 году Е. Гольдманн показал, что после интратекальной инъекции трипанового синего в поясничный мешок кролика он проникает в спинной мозг и задний мозг, что свидетельствует о том, что мозг может связывать краситель, а неспособность окрасить мозг после внутривенного введения была вызвана наличием барьера между кровью и мозгом [99].

Однако в 1913 году считалось, что вещества из крови в мозг проходят через промежуточный отсек цереброспинальной жидкости, анатомически локализованный в сосудистом сплетении – место продукции цереброспинальной жидкости [184].

В 1916 году Макинтош и Филдс [171], работая с основными красителями (метиленовым синим и нейтральным красным), которые проникают через ГЭБ, обнаружили, что они быстро окрашивают мозг после внутривенного введения, тогда как цереброспинальная жидкость не окрашивается. Эти наблюдения были подтверждены другими исследованиями, которые показали, что питательные вещества проникали прямо из крови в мозг через стенки кровеносных сосудов без прохождения через цереброспинальную жидкость и что анатомически ГЭБ локализуется в микрососудистой сети мозга [84; 119].

В 1967 году Т. Ризом и М. Карновски с помощью электронной микроскопии было окончательно подтверждено данное предположение [200].

У всех позвоночных животных обнаружен ГЭБ, при этом беспозвоночные организмы также демонстрируют признаки барьерных структур между кровью и нервной тканью [184]. Однако, барьер беспозвоночных имеет преимущественно глиальную структуру, в то время как у позвоночных ГЭБ эндотелиального происхождения. При этом некоторые остатки примитивных глиальных барьеров остаются в ЦНС млекопитающих в областях, где отсутствует сосудистый ГЭБ: пигментный эпителий сетчатки, сосудистое сплетение, танициты в желудочках мозга и питуициты в системе гипоталамус-гипофиз [158].

ГЭБ состоит из кровеносных сосудов, образованных специализированными эндотелиальными клетками, базальной мембраны, перицитов и астроцитов (рисунок 1) [96; 159; 167].

Эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера имеют ряд отличий от таковых в периферических тканях [140; 204]:

- 1) Более низкое число эндоцитарных везикул, что ограничивает трансцеллюлярный транспорт;
- 2) Отсутствие пор;

- 3) Высокое электрическое сопротивление благодаря узким соединениям, которые также ограничивают парацеллюлярный транспорт;
- 4) Более высокий объем митохондрий, который отражает увеличенную интенсивность клеточного метаболизма;
- 5) Наличие специализированных транспортных систем.

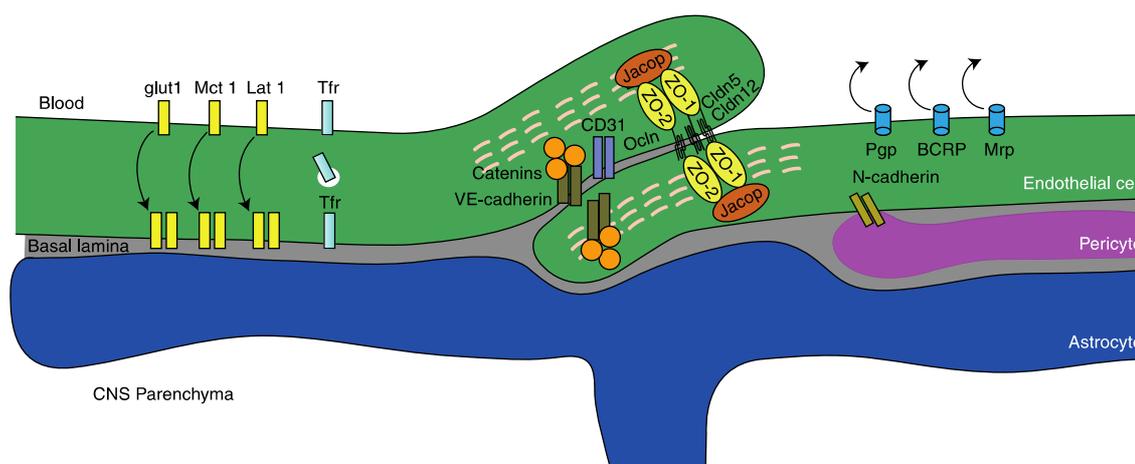


Рисунок 1 — Строение гематоэнцефалического барьера по R. Daneman, A. Prat [96]

На субклеточном уровне главными компонентами, отвечающими за структурную целостность гематоэнцефалического барьера, являются межклеточные соединения эндотелиальных клеток, среди которых выделяют следующие виды (рисунок 2) [228]:

- 1) Адгезионные соединения (промежуточные соединения или опоясывающая десмосома). Располагаются наиболее близко к базолатеральной мембране, включают АЖ-белки (adherens junction), VE-кадгерины (vascular endothelial), тромбоцитарные адгезивные молекулы эндотелиальных клеток (PECAM-1) и образуют гомофильные контакты между двумя эндотелиальными клетками шириной около 20 нм [97]. Данные белки связаны с цитоскелетом катенинами. АЖ-белки модулируют сигнализацию рецепторов и регулируют трансэндотелиальную миграцию лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов. Фосфорилирование тирозина

VE-кадгерина требуется для трансэндотелиального проникновения лейкоцитов в мозг [226; 232].

2) Щелевые соединения.

Щелевые соединения включают в себя ряд коннексинов (CX37, CX40 и CX43) и образуют полуканалы между эндотелиальными клетками. Они обеспечивают эндотелиальные межклеточные коммуникации и поддерживают герметичность соединения [178; 228].

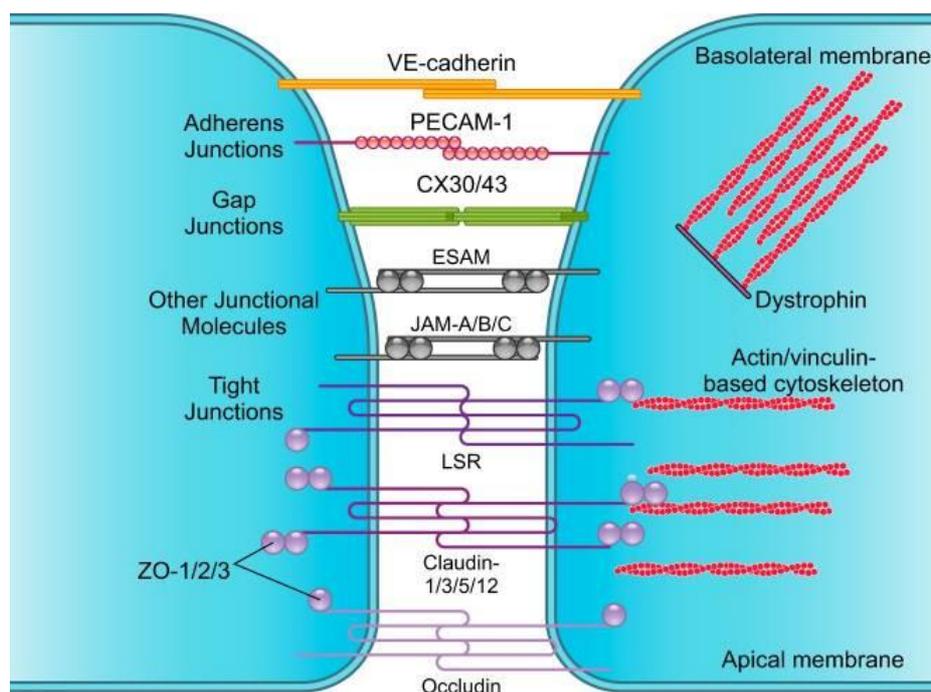


Рисунок 2 — Межклеточные соединения эндотелиальных клеток по Sweeney M.D. et al. [228]

3) Плотные соединения.

Этот вид соединений располагается наиболее близко к апикальной мембране. К белкам плотных соединений относятся клаудин-1, -3, -5 и -12 и окклюдин, ограничивающие парацеллюлярную диффузию растворенных веществ и ионов через ГЭБ. Потеря клаудинов связана с нарушением структуры ГЭБ при нейродегенеративных [227] и острых заболеваниях ЦНС [246].

Белки плотных соединений контактируют с актиновыми и винкулиновыми цитоскелетными нитями через каркасные белки мембраносвязанного семейства гуанилаткиназ ZO-1 (Zonula occludens), ZO-2 и ZO-3 [233]. Дефицит ZO-1 приводит к нарушению структуры ГЭБ при многих нейродегенеративных и остро

протекающих патологических процессах в ЦНС. Кроме того, ГЭБ экспрессирует белок плотных соединений LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein), также известный как ангиолин-1 [222].

4) Перицит-эндотелиальные соединения.

Перициты имеют общую базальную мембрану с эндотелиальными клетками капилляров головного мозга. Прямые контакты типа «шип-разъем» между перицитами и эндотелиальными клетками образованы N-кадгерином. Полуканалы щелевых соединений CX43 обеспечивают межклеточную связь между перицитами и эндотелиальными клетками [229].

5) Соединения астроцитов.

Астроциты экспрессируют белки щелевых соединений CX30 и CX43. Специфичный для астроцитов нокаут CX43 и/или двойной нокаут CX43 и CX30 ослабляют ГЭБ, приводя к астроцитарному отеку, потере периваскулярной полярности концевых ножек астроцитов и повышенной лейкоцитарной инфильтрации ткани мозга [80; 112; 226].

6) Соединения с базальной мембраной.

Эндотелиальные клетки взаимодействуют с белками внеклеточного матрикса в базальной мембране капилляров – коллагеном, перлеканом и ламинином – через α - и β -интегриновые рецепторы, которые образуют трансмембранные гетеродимеры, функционально связывающие внеклеточный матрикс с клеточным цитоскелетом [226].

Интегрины опосредуют клеточную сигнализацию, воспринимая сигналы от лигандов внеклеточного матрикса, факторов роста и рецепторов факторов роста, которые регулируют многочисленные функции эндотелиальных клеток, включая выживание, миграцию, дифференцировку, адгезию и полярность. Дисфункция интегринов приводит к нарушениям ГЭБ, что было показано в опытах на мышах с нокаутом β 1-эндотелиального интегринина: отмечено развитие aberrантной сигнализации VE-кадгерина, потеря клаудина-5 и незрелость ГЭБ [241].

7) Другие соединительные молекулы.

К данной группе относятся молекулы адгезии эндотелиальных клеток (ESAM) и структурно подобные молекулы JAM-A (junctional adhesion molecule), JAM-B и JAM-C, которые модулируют герметичность соединений, аналогично AJ-белкам, и регулируют трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов [226].

Перициты — это клетки, которые располагаются на аблюминальной поверхности микрососудистой эндотелиальной трубки и встроены в сосудистую базальную мембрану [96].

Перициты вытягивают длинные отростки вдоль аблюминальной (базальной) поверхности эндотелия, которые часто могут охватывать несколько тел эндотелиальных клеток. Эти клетки содержат сократительные белки и обладают способностью сокращаться, чтобы контролировать диаметр капилляра [128]. Хотя перициты выстилают эндотелиальную трубку, большая часть клеточного тела и отростков не соприкасается с эндотелием, а отделяется базальной мембраной, в которую они встроены.

Перициты играют важную роль в регуляции ангиогенеза, инфильтрации иммунных клеток и кровотока в ответ на нервную иннервацию, образовании внеклеточного матрикса и заживлении ран. Предполагается, что они также могут быть стволовыми клетками ЦНС [73].

Кроме того, было показано, что перициты играют важную роль в регуляции формирования ГЭБ во время эмбриогенеза, а также в поддержании его функции во взрослом возрасте и старении [96]. С использованием нокаутных мышей было выявлено, что перициты играют решающую роль в целостности ГЭБ – в частности, в регуляции трансцеллюлярного транспорта [229]. Генетическая абляция перицитов не влияла на целостность плотных соединений, что свидетельствует о том, что парацеллюлярный транспорт регулируется независимо от трансцеллюлярного [229].

Базальная мембрана. Эндотелиальная сосудистая трубка окружена двумя базальными мембранами, внутренней сосудистой базальной мембраной и наружной паренхиматозной базальной мембраной, также называемой vascular glia

limitans perivascularis [96; 224]. Сосудистая базальная мембрана – это внеклеточный матрикс, секретируемый эндотелиальными клетками и перицитами, тогда как паренхиматозная базальная мембрана в основном секретируется астроцитами, которые распространяются в направлении сосудистой стенки. Эти базальные мембраны состоят из секретируемых молекул, включая коллагены IV типа, ламинин, нидоген, протеогликаны, гепарин и другие гликопротеины. Сосудистая и паренхиматозная базальные мембраны имеют различный состав, например, первая состоит из ламининов A4 и A5, тогда как последняя содержит ламинины A1 и A2 [96; 224]. Эти базальные мембраны выполняют якорную функцию для многих сигнальных процессов в сосудистой системе, но также обеспечивают дополнительный барьер для молекул и клеток, чтобы ограничить их проникновение к нервной ткани. Нарушение базальной мембраны матриксными металлопротеиназами является важным компонентом дисфункции ГЭБ и лейкоцитарной инфильтрации, которая наблюдается при многих неврологических заболеваниях [96; 224].

Астроциты являются наиболее многочисленным типом клеток в ЦНС позвоночных, и их специализированные «конечные ножки» (пластинчатые расширения на концах отростков) покрывают почти всю поверхность микрососудов ЦНС [91; 159]. Астроциты находятся в тесной связи с микрососудами головного мозга, а различные белки астроцитов, такие как аквапорин-4 (Aqp4) и калиевый канал Kir4.1, локализируются на концевой мембране «ножки» для регуляции гомеостаза воды. Кроме того, Aqp4 вовлечен в поток интерстициальной жидкости и является частью так называемой «глимфатической системы». Астроциты улучшают барьерную функцию эндотелия либо в моделях ко-культуры, либо путем введения кондиционированной среды в единичные культуры эндотелиальных клеток *in vitro* [91]. Астроциты секретируют Shh-полипептид (sonic hedgehog), ретиноевую кислоту и ангиопоэтин-1 (Ang-1) – ключевые факторы, индуцирующие и поддерживающие барьерные свойства эндотелия головного мозга. Взаимодействие астроцитов и эндотелиальных клеток имеет важное значение не только для формирования и поддержания структурной

целостности ГЭБ, но и для дифференцировки астроцитов. Эндотелиальные клетки выделяют такой фактор, как ингибирующий лейкоз фактор 1 (LIF1), который поддерживает дифференцировку астроцитов. Это, в свою очередь, индуцирует экспрессию Src-супрессированного субстрата С-киназы (SSeCKS), что приводит к астроцитарной секреции Ang-1, который стабилизирует сосуды через связывание Tie2/TEK с эндотелиальными клетками [109].

1.1.2. Транспорт веществ через гематоэнцефалический барьер

Питательные вещества, ионы и другие молекулы пересекают ГЭБ путем парацеллюлярной диффузии через соединительные контакты или трансцеллюлярно через клетки, как представлено на рисунке 3 [120; 230].

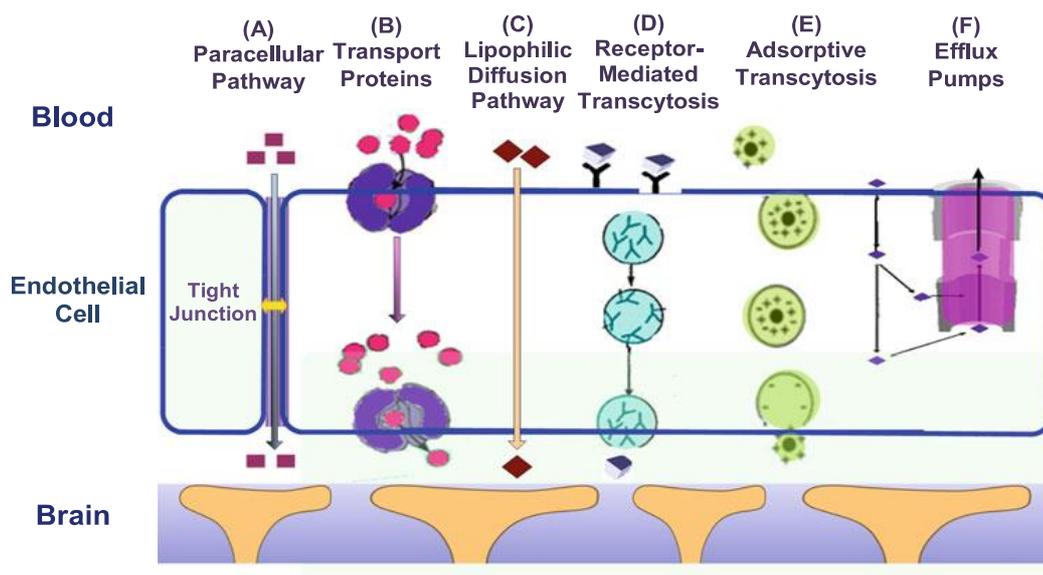


Рисунок 3 — Виды транспорта через гематоэнцефалический барьер по Bingmei M Fu [120]

1) *Парацеллюлярный транспорт.* Парацеллюлярный транспорт – это процесс пассивной диффузии, который состоит из движения липофильных или низкомолекулярных гидрофильных веществ через ГЭБ, в зависимости от электрохимического, гидростатического и осмотического градиента. Этот механизм структурно опосредован плотными соединениями. Тем не менее,

парацеллюлярная диффузия играет лишь незначительную роль в транспорте нейротропных лекарственных веществ [185].

Проницаемость ГЭБ путем пассивной диффузии для большинства молекул может быть оценена на основе их коэффициента разделения октанол / вода [207]. Например, дифенгидрамин (Димедрол[®]), обладающий высоким коэффициентом разделения, легко проникает через ГЭБ, тогда как водорастворимый лоратадин (Кларитин[®]) не способен проникать через ГЭБ и мало влияет на ЦНС [144].

2) *Трансцеллюлярный транспорт.* Трансцеллюлярный транспорт, который может быть энергозависимым и энергонезависимым, включает в себя трансклеточную диффузию как через люминальную, так и через аблюминальную мембрану эндотелия капилляров; рецептор-опосредованный трансцитоз; эффлюксную транспортную систему; эндоцитоз положительно заряженных молекул и транспорт, опосредованный переносчиками [185; 230].

а) *Рецептор-опосредованный трансцитоз.* Это основной механизм, используемый эндотелиальными клетками мозга для поглощения молекул с высокой молекулярной массой, таких как гормоны или белки: инсулин, лептин, липопротеины низкой плотности, трансферрин и IGF. Этот путь является активным транспортным путем, который зависит от температуры и степени насыщения. Взаимодействие рецептора с лигандом приводит к образованию покрытых оболочкой инвагинаций, которые в конечном итоге поглощают лиганд путем образования эндоцитарного пузырька. На второй стадии происходит диссоциация комплекса рецептор-лиганд [209] с последующим высвобождением содержимого пузырька путем экзоцитоза. Однако не все везикулы успешно пересекают ГЭБ, так как некоторые сливаются с лизосомами и их содержимое теряется из-за низкого pH и ферментативного гидролиза [209]. Было высказано предположение, что это целевой путь для доставки лекарственных веществ в ЦНС, поскольку он не ограничен размером молекул и не зависит от их липофильности. Кроме того, он считается безопасным и эффективным благодаря своей высокой специфичности и использованию полностью физиологического механизма [230].

b) *Эффлюксная транспортная система.* Основными представителями эффлюксной транспортной системы ГЭБ являются ABC (ATP-binding cassette) - транспортеры. Данные переносчики, используя энергию АТФ, переносят субстраты из паренхимы к люминальной мембране и обратно в системный кровоток против градиента концентрации, таким образом препятствуя их проникновению в ткань мозга. Их субстратами являются преимущественно липофильные вещества [197]. Основными представителями ABC-транспортеров в ГЭБ являются: гликопротеин-P (Pgp, ABCB1, MDR1-белок), BCRP (breast cancer resistance protein, ABCG2) и MRP (multidrug resistance protein, ABCC1-ABCC6) [160; 211; 212; 226].

c) *Эндоцитоз положительно заряженных молекул.* Положительно заряженные вещества, такие как катионизированный альбумин и гистон, взаимодействуют с отрицательно заряженными компонентами мембраны эндотелиальных клеток и затем подвергаются эндоцитозу [192]. Этот биологический путь может быть использован для увеличения доставки конъюгированных препаратов через ГЭБ, как это происходит с b-эндорфином, конъюгированным с катионизированным альбумином [192].

d) *Транспорт, опосредованный переносчиками.* Транспорт, опосредованный переносчиками – это насыщаемый транспортный процесс, который может быть энергозависимым или независимым, и опосредует обмен веществ между системным кровообращением и паренхимой головного мозга [82]. Данный вид транспорта в основном осуществляется SLC-транспортёрами (solute carrier transporters).

SLC-транспортеры используют электрохимическую разность потенциалов или градиент ионов, для транспортировки своих субстратов через биологические мембраны, то есть работают без затраты энергии АТФ. SLC-транспортеры могут локализоваться как на люминальной, так и на аблюминальной мембране и обеспечивают, в основном проникновение веществ через ГЭБ в ткань мозга, то есть являются инфлюксными транспортерами [161].

В отличие от ABC-транспортеров, субстратами SLC-транспортеров являются преимущественно эндогенные полярные молекулы.

Geier E.G. et al. обнаружили экспрессию 244 генов SLC-транспортеров в микрососудах головного мозга человека [122]. Основными их представителями являются следующие транспортеры: переносчик глюкозы GLUT1 (SLC2A1) – осуществляет транспорт глюкозы в головной мозг по градиенту концентрации; MCT1 (SLC16A1) – транспортирует короткоцепочечные монокарбоксилаты; LAT1 (large neutral transporter, SLC7A5) – катализирует обмен двух аминокислот в соотношении (1:1, L-лейцин, изолейцин и метионин чаще подвергаются эффлюксу, чем инфлюксу); АТВ⁰⁺ (SLC6A14) – транспортирует нейтральные и основные аминокислоты с симпортом 2Na⁺ и 1 Cl⁻ и т.д. [161; 180].

1.1.3. Строение и локализация гликопротеина-P

Самым изученным белком из группы ABC-транспортеров в ГЭБ является гликопротеин-P (от слова permeability, Pgp, ABCB1, MDR1-белок) [218].

Pgp представляет собой крупный трансмембранный гликопротеин, состоящий из 1276-1280 аминокислот, с молекулярной массой 170 кДа (из них пептидный фрагмент составляет 150 кДа) [71; 181]. Молекула Pgp состоит из двух гомологичных частей, которые соединены между собой подвижным линкерным полипептидом [110]. Каждая половина Pgp состоит из гидрофобного трансмембранного домена (TMD) и консервативного цитоплазматического домена, включающего АТФ-связывающий сайт (NBD) [218]. Каждый трансмембранный домен включает в себя 6 трансмембранных сегментов (TMS) 1-6 и 7-12 [164], образующих вместе внутреннюю полость, открытую в цитоплазму и цитоплазматическую мембрану, которая может одновременно вмещать, по меньшей мере, две молекулы субстратов (рисунок 4) [71].

В организме человека и кролика Pgp кодируется геном *MDR1*, а у крыс и мышей — генами *mdr1a* (также называемым *mdr3*) и *mdr1b* (также называемым *mdr1*) [127; 210; 235]. Ранее считалось, что у человека Pgp также может кодироваться геном *MDR3* (иногда его обозначают *MDR2*) и геном *mdr2* – у мышей. Однако было выявлено, что данные гены кодируют флиппазу фосфолипидов,

экспрессирующуюся в билиарных мембранах гепатоцитов и играющую важную роль в секреции фосфатидилхолина в желчь. По международной классификации данный ген обозначается как *ABCB4* [127]. Несмотря на это, в некоторых базах данных лекарственных препаратов (например, <https://www.drugbank.ca>) сохраняется устаревшее подразделение Pgp на Pgp I, кодируемый геном *MDR1*, и Pgp II, кодируемый геном *MDR2*.

Для Pgp характерна широкая субстратная специфичность. Его субстратами являются в основном липофильные вещества с молекулярной массой 330 – 4000 Да, среди которых препараты таких фармакологических групп, как сердечные гликозиды, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, противоопухолевые средства, антикоагулянты и др. [20].

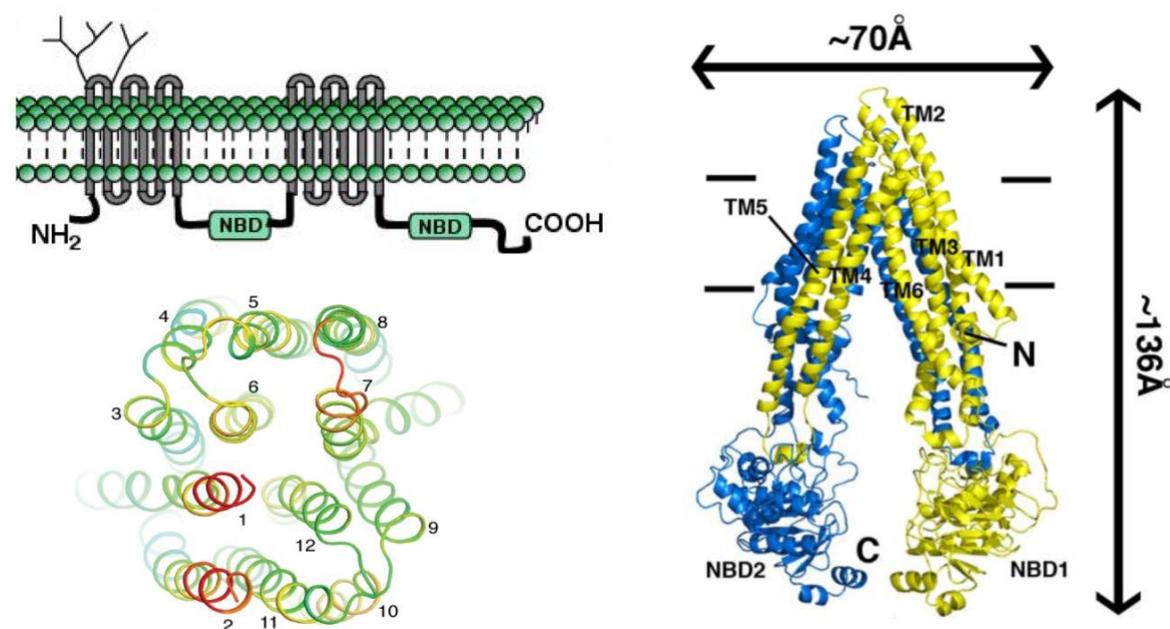


Рисунок 4 — Структура гликопротеина-P по S.G. Aller et al. [71]; Y. Kim, J. Chen, 2018 [148]

Впервые Pgp был выделен Juliano R.L. и Ling V. из клеточной мембраны опухолевых клеток яичника китайского хомячка [139]. В дальнейшем было показано наличие данного белка-транспортера в апикальной мембране эпителия кишечника и в проксимальных почечных канальцах, билиарной мембране клеток печени, в надпочечниках, в человеческих кровяных стволовых клетках,

НК-клетках, антиген-представляющих дендритных клетках, Т и В-лимфоцитах [151]. Показано, что Pgp также имеет ограниченную экспрессию в развивающемся эмбрионе и ступенчато экспрессируется в плаценте [166; 234].

В 1994 г. Schinkel с коллегами выявили экспрессию *mdr1a* в эндотелиальных клетках гематоэнцефалического барьера и с использованием нокаутных по данному гену мышей показали важную роль Pgp в защите головного мозга от проникновения ксенобиотиков [210].

Большинство исследований показывает, что Pgp преимущественно экспрессируется на апикальной мембране эндотелиальных клеток мозговых капилляров млекопитающих, включая человека [100; 212; 226]. Данное расположение Pgp является оптимальным для выброса его субстратов обратно в кровь в случае их попадания оттуда в эндотелиальные клетки. При отсутствии Pgp в ГЭБ, как, например, у мышей с нокаутом гена *mdr1a*, степень проникновения таких веществ в мозг повышается в 10-100 раз, что зачастую приводит к проявлению токсических эффектов. Более того, блокада Pgp в ГЭБ путём церебрального введения ингибиторов Pgp приводит к значительному увеличению внутримозговой концентрации различных лекарственных веществ, что снова подтверждает эффлюксную функцию Pgp в ГЭБ [165; 207].

Однако было обнаружено и некоторое противоречие относительно локализации Pgp в ГЭБ. Так, в исследованиях Pardridge et al. [190] с использованием мышинных MRK16-моноклональных антител к человеческому Pgp выявлено, что рисунок локализации Pgp в мозге человека и приматов был аналогичен таковому у глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) – белка, найденного в астроцитах. Также в данном исследовании авторы показали, что Pgp не располагается совместно с эндотелиальным транспортёром глюкозы GLUT1. Похожие результаты были получены и при использовании нефиксированных изолированных капилляров головного мозга человека [125]. Это заставило авторов предложить обновленную модель множественной лекарственной устойчивости в головном мозге, согласно которой Pgp расположен преимущественно в нижних отростках астроцитов, обволакивающих мозговые микрососуды, нежели чем в

апикальной мембране эндотелиальных сосудов [124]. В данной модели увеличение соотношения концентраций субстратов Pgp в мозге и плазме, наблюдаемое у *mdr1a*-нокаутированных мышей и животных, которым вводили ингибиторы Pgp, можно обосновать увеличением внутриклеточной концентрации в астроцитах, у которых снижена или полностью выключена функция Pgp, таким образом трактуя увеличение распространения субстратов Pgp в головном мозге. Однако данная модель не может объяснить увеличение внеклеточной концентрации лекарственных веществ в головном мозге, что было выявлено при проведении микродиализа у грызунов. Данные результаты и заключения были поставлены под сомнение, так как экстрацеллюлярный эпитоп человеческого Pgp для моноклональных антител MRK16 может быть полностью блокирован в некоторых клетках интенсивным N-гликозилированием [1; 211]. Учитывая также высокую чувствительность методики иммуногистохимического анализа к малейшим отклонениям условий пробоподготовки от оптимальных, что приводит к разрушению эпитопов и неспецифичному связыванию первичных антител, иммунолокализация Pgp может считаться достоверной только по результатам, полученным с использованием как минимум двух различных антител [208; 211]. В последних исследованиях с использованием кроличьих поликлональных антител (*mdr*-(Ab-1)) к Pgp и при различных способах фиксации ткани, Schlachetzki и Pardridge [213] продемонстрировали экспрессию Pgp одновременно и в астроцитах, и в эндотелии мозга здорового примата. Хотя в большинстве случаев однозначно обнаружить Pgp в астроцитах не получается, в условиях отсутствия патологии со стороны ЦНС, при ряде заболеваний (например, эпилепсия) обнаруживается явная экспрессия Pgp именно в астроцитах [169; 221]. В экспериментах было установлено, что при определённых физиологических состояниях Pgp может как преимущественно экспрессироваться в эндотелиальных клетках капилляров, так и в паренхиматозных и периваскулярных астроцитах, хотя и значительно слабее. При судорогах наблюдается значительное повышение экспрессии Pgp в этих типах клеток и в самих нейронах [238].

Экспрессия Pgp в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга, периваскулярных астроцитах, паренхиматозных астроцитах и нейронах свидетельствует о том, что функции Pgp могут быть значительно более широкими, чем предполагалось ранее.

1.2. Фармакокинетика и фармакодинамика

этилметилгидроксипиридина сукцината в организме человека и животных

1.2.1. Фармакокинетика этилметилгидроксипиридина сукцината

Синтез сукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина был осуществлён в НИИ фармакологии РАМН (Смирнов Л. Д., Кузьмин В. И.), затем были выявлены его специфические фармакологические эффекты и механизмы действия (Воронина Т. А., Середенин С. Б., Тилекеева У. М., Неробкова Л. Н., Лукьянова Л. Д., Еременко А. В., Алиев А. Н. и др.), исследованы безопасность (Любимов Б. И., Смольникова Н. М., Сорокина А. С.) и фармакокинетика (Сариев А. К., Жердев В. П.), определён товарный знак «Мексидол» (МНН: этилметилгидроксипиридина сукцинат) и осуществлена регистрация препарата в МЗ СССР [12].

Фармакокинетика ЭМГПС подробно изучена в экспериментальных исследованиях [38; 41; 51]. При этом в большинстве работ анализировалась концентрация оксипиридинового компонента данного вещества.

В эксперименте на кроликах-самцах породы Шиншилла выявлено, что ЭМГПС быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта после внутрижелудочного введения в дозе 100 мг/кг массы тела. Максимальная концентрация в крови достигается в среднем через 30 мин после введения, $T_{1/2}$ составляет 2,3 ч, а среднее время удерживания — 3,2 ч. Препарат перестаёт детектироваться в плазме крови через 5 ч после введения [12; 53].

У крыс Wistar после внутрижелудочного введения в дозе 200 мг/кг массы тела максимальная концентрация этилметилгидроксипиридина (ЭМГП) обнаруживается через 1 ч после введения, а через 5 ч снижается ниже предела количественного определения [52].

В клинических исследованиях показано, что при внутримышечном введении данного вещества в дозе 400-500 мг максимальная концентрация в плазме крови

достигается в среднем через 0,58 ч и составляет 3,5-4,0 мкг/мл. Среднее время удерживания ЭМГП составляет 1 ч, а через 4 ч препарат почти не регистрируется в плазме крови добровольцев [51].

ЭМГП быстро распределяется в органы и ткани, в том числе и в головной мозг, проникая через ГЭБ. Так, у крыс Wistar при внутрижелудочном введении ЭМГПС в дозе 200 мг/кг массы тела пик концентрации ЭМГП в гомогенате коры больших полушарий и продолговатого мозга отмечается через 1-1,5 ч с момента введения, постепенно снижаясь к 4 часу [52].

Также обнаружено, что ЭМГП способен проникать внутрь митохондрий, где максимальная концентрация обнаруживается через 1,5 ч после интрагастрального введения [53].

ЭМГП подвергается биотрансформации в печени. У крыс было идентифицировано 5 его метаболитов [38]:

- 1) фосфат 3-оксипиридина;
- 2) 2,6-диметил-3-оксипиридин;
- 3) 6-метил-3-оксипиридин;
- 4) глюкуроноконъюгат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина;
- 5) глюкуроноконъюгат фосфата 2-этил-6-метил-3-оксипиридина.

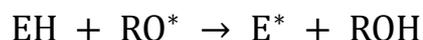
ЭМГПС может повышать активность изоформы 3A4 цитохрома P450, то есть является его индуктором [3], и снижать активность Pgp, то есть является его ингибитором [62].

ЭМГП выводится преимущественно в виде глюкуроноконъюгата: после перорального введения препарата у людей с мочой через 12 ч экскретируются следовые количества ЭМГП и половина введённого вещества в виде конъюгата [37].

1.2.2. Фармакодинамика этилметилгидроксипиридина сукцината

Фармакологические эффекты, которыми обладает ЭМГПС, обусловлены двумя его структурными компонентами: остатком производного 3-оксипиридина — антиоксидантный эффект, сукцинатом — антигипоксическая активность [10; 11; 51].

Антиоксидантное действие ЭМГП связано с наличием в его структуре подвижного атома водорода в составе гидроксигруппы, что объясняет его свойства как донатора протона. ЭМГП реагирует с продуктами перекисного окисления липидов – перокси- и алкокси-радикалами – по следующей схеме [14]:



где EH – ЭМГП с подвижным атомом водорода

RO* - алкокси-радикалы/перокси-радикалы,

E* - ЭМГП без подвижного атома водорода,

RON – нейтрализованный продукт окисления липидов.

В исследовании *in vitro* показано, что ЭМГПС способен подавлять неферментативное (аскорбатзависимое) и ферментативное (НАДФ*Н₂-зависимое) железоиндуцированное перекисное окисление липидов в гомогенатах мозга (концентрации 0,3 – 12,5 мМ); связывает супероксидный анион-радикал (концентрации 1,25 – 3,125 мМ); повышает активность Se-зависимой глутатионпероксидазы (концентрации 0,1–1 мМ), подавляет активность индуцибельной NO-синтазы (концентрации 0,05 – 0,5 мМ) [50].

ЭМГПС в концентрациях 0,05 – 0,5 мМ связывает супероксидный анион-радикал в модельной системе ксантин-ксантинооксидаза – люцигенин [19].

В модельной системе Fe²⁺-индуцированного перекисного окисления липидов с использованием в качестве субстратов апо-В-содержащих липопротеинов сыворотки крови здоровых доноров показано, что ЭМГПС дозозависимо (концентрации 0,4 – 3,9 мМ) уменьшает выраженность окислительного стресса [45].

Янтарная кислота, входящая в состав ЭМГПС, является субстратом сукцинатного ФАД-зависимого звена цикла Кребса. В условиях гипоксии данное звено отключается позже НАД-зависимых оксидаз, что дает возможность сукцинату поддерживать работу дыхательной цепи [24].

Было показано, что сукцинат может действовать и как лиганд орфанного рецептора GPR19, сопряженного с G-белками. Данный рецептор обнаружен в

почках (клетки юктагломерулярного аппарата, эпителий проксимальных канальцев), сосудах, печени, селезёнке [24; 28].

Выявлено, что ЭМГПС, стимулируя рецепторы SUCNR1 и PGC-1 α , увеличивает уровень каталитических субъединиц дыхательных ферментов митохондрий (NDUFB2, SDHA, cyt b, COX1), АТФ-синтазы (ATP5A) и эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) в коре головного мозга крыс [16; 17; 65].

Кроме антиоксидантного и антигипоксического эффекта было показано, что ЭМГПС повышает сродство ГАМК-эргического, бензодиазепинового и ацетилхолинового рецепторов к лигандам [39], модулирует активность мембраносвязанных ферментов — кальцийнезависимой фосфодиэстеразы, аденилатциклазы, альдоредуктазы, ацетилхолинэстеразы [32].

Также установлено, что ЭМГПС повышает содержание полярных фракций липидов – фосфатидилсерина и фосфатидилинозита, снижает соотношение холестерин/фосфолипиды в мембранах клеток, уменьшает вязкость и увеличивает их текучесть [13].

Учитывая разнонаправленность уже изученных механизмов действия ЭМГПС, можно предположить наличие и других, ещё неизученных механизмов влияния на организм, которые могут быть использованы для обоснования клинической эффективности препарата при различных заболеваниях и целесообразности включения его в схемы лечения.

1.3. Гипоксия как типовой патологический процесс

1.3.1. Молекулярные механизмы развития гипоксии

Гипоксия — типовой патологический процесс, развивающийся в результате недостаточности биологического окисления, приводящий к нарушению энергетического обеспечения функций и пластических процессов в организме. Данное определение термина «гипоксия» обозначает абсолютную или относительную недостаточность реального энергообеспечения по сравнению с уровнем функциональной активности и интенсивности пластических процессов

как на уровне целостного организма, так и на уровне отдельных органов и тканей [23].

Гипоксия играет ключевую роль в патогенезе многих заболеваний и их осложнений: ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярная болезнь, рак, хронические болезни лёгких, хроническая сердечная недостаточность и др. [215].

Мозг является одним из наиболее метаболически активных органов в организме человека, потребляющим большое количество кислорода и глюкозы, нормальное функционирование которого сильно зависит от производства энергии в ходе окислительного фосфорилирования [170]. При снижении кровоснабжения головного мозга происходит развитие гипоксии нейронов, что в свою очередь запускает комплекс нейрохимических процессов, которые называют ишемическим каскадом, представляющим собой сложную серию событий, развивающихся во времени. Поскольку любое событие в каскаде может вызывать или может быть вызвано множеством других событий, а клетки, страдающие различной степенью ишемии, могут проходить через различные химические процессы, то можно сказать, что ишемический каскад является весьма неоднородным явлением. Тем не менее, обобщённо его можно охарактеризовать как клеточную биоэнергетическую недостаточность из-за фокальной гипоперфузии головного мозга, за которой следуют эксайтотоксичность, окислительный стресс, нарушение функции гематоэнцефалического барьера, микрососудистое повреждение, гемостатическая активация, постишемическое воспаление и, наконец, гибель нейронов, глии и эндотелиальных клеток [85; 170].

При снижении кровотока ниже 50 мл/100 г в минуту ингибируется синтез белка, при его дальнейшем уменьшении ниже 30 мл/100 г в минуту нарушается клеточный метаболизм [168].

При долговременной адаптации к гипоксии важнейшую роль играет повышение синтеза транскрипционных факторов (белки, контролирующие процесс синтеза мРНК за счет связывания со специфичными участками ДНК), наиболее важным из которых является фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1).

Транскрипционный фактор HIF-1 состоит из двух белковых субъединиц — HIF-1 α и HIF-1 β . Функциональный статус HIF-1 определяется экспрессией и активностью его α -субъединицы. Данная регуляция осуществляется на нескольких уровнях: экспрессия мРНК, синтез белка, ядерная локализация и трансактивация HIF-1. В условиях нормоксии кислород-зависимые пролин-гидроксилазы модифицируют пролин в структуре HIF-1 α [131; 176]. Дополнительно гидроксирование аспарагинового фрагмента в HIF-1 α блокирует взаимодействие между p300/CBP транскрипционными коактивирующими белками и α -субъединицей, предотвращая транскрипцию ряда генов [187]. Наконец, гидроксированный пролин становится убиквитинированным и HIF-1 α полностью подвергается протеосомальной деградации. Обобщая вышесказанное, можно сказать, что высокие концентрации кислорода препятствуют развитию эффекта HIF-1 и накоплению его активной формы.

При гипоксии или бактериальном инфицировании пролин-гидроксилазы неактивны. В таких условиях α - и β -субъединицы способны связываться друг с другом и формировать комплекс с p300/CBP транскрипционными коактивирующими протеинами [72; 101; 187]. Образовавшийся комплекс индуцирует транскрипцию ряда генов, участвующих в поддержании кислородного гомеостаза и метаболизма. В таблице 1 указаны белки, синтез которых наиболее интенсивно активируется под действием HIF-1 и которые участвуют в процессах пролиферации и жизнеобеспечения клеток, энергетического обмена, эритропоэза, ангиогенеза, вазомоторной реакции [215].

Одной из основных функций HIF-1 является предотвращение повреждения тканей, вызванного ишемией различного происхождения. Данная функция может быть достигнута двумя основными механизмами:

- 1) Перевод клеточного метаболизма на анаэробные реакции;
- 2) Усиление васкуляризации ишемизированных участков с целью улучшения доставки кислорода.

Таблица 1 — Перечень основных белков, синтез которых активируется под действием HIF-1 α по Semenza G.L., 2002 [215]

Аденилат-киназа-3	Гексокиназа-2
α 1В-адренергический рецептор	Инсулиноподобный фактор роста II (IGF II)
Адреномедулин	IGF-связывающий протеин 1
Альдолаза А	IGF-фактор связывающий протеин 3
Альдолаза С	Лактатдегидрогеназа А
Регулятор апоптоза Bcl-2	NO-синтаза 2
Эндотелин-1	p21 (циклин-зависимый ингибитор киназы 1)
Энолаза 1	p35srj (p300-СН1-взаимодействующий белок)
Эритропоэтин	Фосфофруктокиназа L
Транспортёр глюкозы 1 (GLUT-1)	Фосфолицераткиназа 1
Транспортёр глюкозы 2 (GLUT-2)	Пируваткиназа М
Транспортёр глюкозы 3 (GLUT-3)	Трансферрин
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	Рецептор трансферрина
Гемоксигеназа-1	Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF)
Гексокиназа 1	VEGF-рецептор FLT1

Ряд исследований показывает, что повышение экспрессии HIF-1 ускоряет ангиогенез в ишемизированных участках, что может привести к увеличению оксигенации органов [130; 199]. Общий механизм данного эффекта заключается в стабилизации и активации субъединицы HIF-1 α , при этом гидроксилазы, vHL-протеин (von Hippel-Landau protein) и PHD2 (prolyl-hydroxylase domain protein 2) становятся неактивными в условиях недостатка кислорода.

Активация HIF-1 также играет ключевую роль в подготовке к условиям ишемии, что обеспечивает защиту от последующих повреждений при гипоксии. Гены эритропоэтина и VEGF наиболее вероятно являются основной мишенью HIF-1, который активируется при ишемии мозга и сердца [76; 87; 157]. При гипоксии также предварительно активируются гены адреномедулина, GLUT-1, пропил-4-гидроксилазы, металлотioneина-1, MKP-1, CELF (CUG-BP and ETR3-like factor) протеинов, 12-липоксигеназы, тканевого активатора плазминогена (tPA) [76].

Современными исследованиями выявлено, однако, что HIF-1 α способен опосредовать NLRP3-инфламмасомо-зависимый пироптоз и апоптоз, ведущий к гибели клеток после инсульта [138], а также активацию TRAIL-индуцированного нейронального апоптоза после черепно-мозговых травм [114]. Также обнаружено снижение степени повреждения ГЭБ при ингибировании HIF-1 α в ходе острой церебральной ишемии, предположительно за счёт сопутствующего снижения активности MMP-2 и VEGF [219].

Обобщая вышеизложенные данные, можно заключить, что при лечении острых цереброваскулярных заболеваний, сопровождающихся гипоксией, рациональным будет ингибирование активности HIF-1 α с целью снижения повреждения ГЭБ, в то время как при лечении хронических форм – повышение активности HIF-1 α с целью формирования долгосрочных механизмов адаптации к гипоксии.

1.3.2. Роль окислительного стресса в патогенезе гипоксии

Не менее важным звеном в патогенезе повреждения нейронов при ишемии/гипоксии является окислительный стресс, связанный с гиперпродукцией свободных радикалов и истощением антиоксидантной системы защиты [129].

Свободные радикалы – это молекулы/молекулярные фрагменты, содержащие один или несколько неспаренных электронов, присутствие которых делает их высокоактивными [129].

Активные формы кислорода (АФК) – разновидность свободных радикалов, представляющих собой производные кислорода, имеющие неспаренный электрон,

и обладающих более высокой реакционной активностью по сравнению с молекулярным кислородом [129].

В физиологических условиях процессы свободнорадикального окисления протекают сбалансировано благодаря многокомпонентной антиоксидантной системе, обеспечивающей инактивацию свободных радикалов и перекисных соединений. Молекулы антиоксидантов, которые составляют систему антиоксидантной защиты в живых системах, действуют на разных этапах развития окислительного стресса. Условно их подразделяют на четыре линии защиты [22; 182].

Первая линия защиты – антиоксиданты, инактивирующие или предотвращающие образование свободных радикалов и их предшественников. Они быстро нейтрализуют молекулы с потенциалом превращения в свободные радикалы или любые другие свободные радикалы со способностью индуцировать генерацию других радикалов, вызывающих таким образом развитие цепной реакции. К этой линии защиты относят три ключевых антиоксидантных фермента: супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу. Эти ферменты дисмутируют супероксидный анион-радикал, расщепляют пероксид водорода и гидропероксиды до безвредных молекул – высокомолекулярных спиртов и молекулярного кислорода. Эта линия защиты также включает белки, связывающие ионы металлов переменной валентности, такие как трансферрин и церулоплазмин, которые хелатируют или изолируют железо и медь соответственно, предотвращая тем самым образование свободных радикалов.

Вторая линия защиты представлена антиоксидантами, инактивирующими свободные радикалы, ингибирующими инициацию и разрывающими цепь свободнорадикальных реакций. Они нейтрализуют или удаляют свободные радикалы, передавая им электроны, при этом становясь радикалами, но с меньшей реакционной способностью. Эти «новые радикалы» легко нейтрализуются и становятся безвредными. К данной линии защиты относятся гидрофильные (аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, глутатион) и липофильные (альфа-токоферол (витамин E) и убихинол) вещества.

Третья линия защиты образована ферментами, которые восстанавливают повреждения биомолекул (белков, липидов и нуклеиновых кислот), вызванные свободными радикалами, а при невозможности регенерации расщепляют их, предотвращая накопление. Типичными представителями данной линии защиты являются ферменты репарации ДНК (полимеразы, гликозилазы и нуклеазы), протеолитические ферменты (протеиназы, протеазы и пептидазы), которые расположены как в цитозоле, так и в митохондриях клеток млекопитающих.

Четвертая линия защиты представлена веществами, активирующими транскрипционные факторы (например, Nrf2), обеспечивающими защиту клеток от воздействия свободных радикалов [182].

Nrf2 – 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.

В физиологических условиях данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap 1, который способствует убиквитированию и протеосомальной деградации Nrf2, а также предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро [141].

После активации комплекс Keap1-Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с антиоксидант-респонсивным элементом (ARE) и активирует транскрипцию защитных ферментов. Известно, что нокаут гена Nrf2 в организме мышей не только нарушает усиление работы генов защитных белков в условиях окислительного стресса, но также приводит к падению уровня транскрипции некоторых (но не всех) из этих генов в нормальных условиях [25].

Данные, полученные в исследованиях *in vivo* с использованием Nrf2-дефицитных мышей, явно демонстрируют критическую роль данного протеина в регуляции экспрессии глутатион-S-трансфераз (GSTs) и НАДФ*Н₂-хинон-оксидоредуктазы [135]. В опытах *in vitro* было выявлено, что Nrf2 контролирует гены, кодирующие и другие ферменты второй фазы биотрансформации, такие как УДФ-глюкуронилтрансферазу 1A6, афлатоксин В1, альдегидредуктазу и

микросомальную эпоксидгидролазу [89; 155]. В дополнение к вышеперечисленному было установлено, что индукция антиоксидантных протеинов при оксидативном стрессе зависит от активации Nrf2 [134]. Так, фактором Nrf2 регулируются гены хемооксигеназы-1, убиквитин/РКС- ζ -связывающего протеина A170, пероксиредоксина-1, тяжелой и легкой цепей ферритина, каталазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и тиоредоксина [89; 92; 134; 147; 155; 195].

Глутатион (GSH) является эффективным сборщиком электрофилов и свободных кислородных радикалов, которые образуются в ходе биохимических реакций внутри клеток. Поэтому очень важно то, что экспрессия гена γ -глутамилцистеинсинтазы (γ -GCS) – энзима, лимитирующего скорость реакции биосинтеза глутатиона – регулируется в целях поддержания оптимального внутриклеточного уровня глутатиона. Nrf2 контролирует и базальную, и индуцибельную экспрессию генов, кодирующих тяжелую и легкую цепи γ -GCS [88; 89; 240]. В некоторых клетках работа системы X_c^- — транспортёра, осуществляющего антипорт внеклеточного L-цистина и внутриклеточного L-глутамата через клеточную мембрану — является крайне важным для поддержания уровня глутатиона. Данная система также контролируется фактором Nrf2 путём влияния на экспрессию одного из двух компонентов данного транспортёра [205].

В общей сложности Nrf2 способен модулировать экспрессию более 200 генов [152].

Индукторы генов ферментов биотрансформации фазы 2 включают в себя соединения 9 химических групп [104]. Хотя эти индукторы имеют только несколько общих свойств, они все могут изменять сульфгидрильные группы путём алкилирования, окисления или восстановления. Распознавание этих свойств показало, что клетки имеют первичные сенсоры, несущие в себе высокореактивные цистеиновые остатки. Keap1 содержит 27 цистеиновых остатков, из которых несколько являются реактивными, таким образом Keap1 может быть прямой мишенью индукторов фазы 2. Избирательные цистеиновые звенья в Keap1 могут взаимодействовать с дексаметазона мезилатом – реактивным

индуктором сульфгидрильных групп – и провоцировать высвобождение Nrf2 из Keap1 [105]. Было также выявлено прямое взаимодействие Keap1 и индуктора фазы 2 – 15-деокси- $\Delta^{12,14}$ -простагландина J₂ (15d-PGJ₂) [136].

Дополнительно к Keap1, потенциально сенсорными молекулами электрофильного или оксидативного стресса могут быть протеинкиназы, например, протеинкиназа С (PKC) [78; 131; 183], внеклеточные сигнальные регулирующие киназы (ERK) [86; 244; 245], p38-митоген-активированные протеинкиназы (МАРК) [70; 75; 86; 244; 245], МАРК/ЕРК-киназа-1 [214], МЕК-киназа [243], фосфатидилинозитол-3-киназа (P13K) [142; 179], PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикулума (PERK) [95].

Современные исследования данного транскрипционного фактора преимущественно посвящены оцениванию его как возможной мишени в лечении нейродегенеративных заболеваний [81] и оценке изменений его физиологических и биохимических свойств в процессе старения [93]. Поскольку вопросы лечения заболеваний нервной системы в настоящее время стоят остро, а также в связи с повышением среднего возраста пациентов и более широкому распространению долгожителей, данные направления становятся все более востребованными и необходимыми.

Таким образом, гиперпродукция свободных радикалов и развитие окислительного стресса является важным звеном патогенеза цереброваскулярных заболеваний, а коррекция возникающих впоследствии нарушений — основной задачей в терапии данных патологий. Потенциально одним из перспективных направлений к решению данной задачи является стимуляция транскрипционного фактора Nrf2.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исследования *in vitro*

2.1.1. Клеточная линия

Исследования *in vitro* выполнены на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2, ФГБУН НИЦ РАН, Санкт-Петербург) [108; 133].

Клетки культивировали в трансвелл-системе (Transwell) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 4500 мг/мл («ПанЭко», Россия), L-глутамин 4 мМ («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% [46; 201].

В работе использовали планшет, содержащий 24 трансвелл-системы с диаметром полупроницаемой 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 [90; 225].

2.1.2. Определение активности гликопротеина-P *in vitro*

Трансвелл-система состоит из двух камер: апикальной и базолатеральной (рисунок 5). На дно апикальной камеры, представляющей собой полупроницаемую мембрану, высевали клетки линии Caco-2.

Оценку активности P_{gp} проводили по транспорту субстрата данного белка – фексофенадина («Sigma-Aldrich», Германия). Для этого питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ раствора Хепеса при pH=7,4 («Sigma-Aldrich», Германия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия).

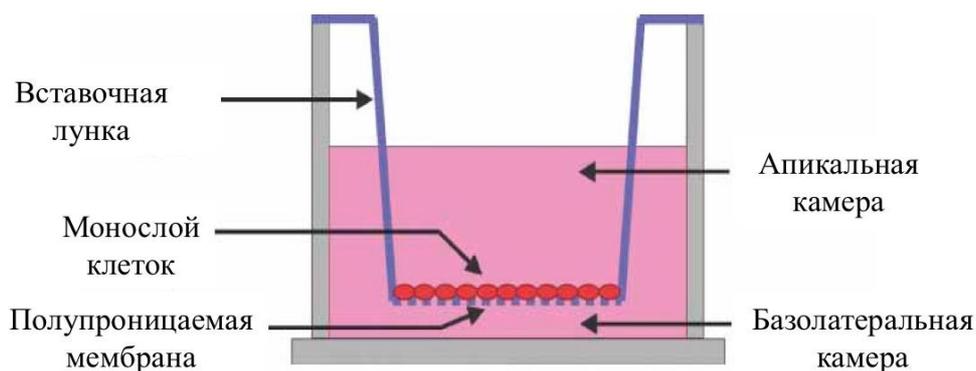


Рисунок 5 — Схема трансвелл-системы

В дальнейшем в апикальную камеру добавляли фексофенадин в концентрации 150 мкМ [194], после чего забирали по 50 мкл образцов из базолатеральной камеры через 1, 2, 3 ч 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 в аналогичной концентрации 150 мкМ добавляли в базолатеральную камеру с последующим забором образцов из апикальной камеры через 1, 2, 3 ч для дальнейшего определения содержания фексофенадина в них.

Транспорт фексофенадина между камерами a и b оценивали по следующей формуле [108]:

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

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 следующей формуле:

$$\text{Отношение коэффициентов} = \frac{P_{app\ b\rightarrow a}}{P_{app\ a\rightarrow b}}$$

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.

2.1.3. Оценка влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность гликопротеина-P *in vitro*

Для оценки влияния ЭМГПС (ООО НПК «Фармасофт», Россия) на активность Pgp *in vitro* его добавляли в обе камеры (апикальную и базолатеральную) вне зависимости от направления транспорта фексофенадина в концентрациях 1, 10, 50, 100, 200 мкмоль/л.

В качестве препарата сравнения использовалась субстанция классического ингибитора Pgp – верапамила («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 $P_{app\ b\rightarrow a}$ к $P_{app\ a\rightarrow b}$ для фексофенадина в присутствии тестируемых веществ.

2.1.4. Определение концентрации фексофенадина в транспортной среде

Концентрацию фексофенадина определяли методом ВЭЖХ-УФ при длине волны 220 нм с использованием хроматографической системы «Стайер» (Россия). При пробоподготовке 50 мкл транспортной среды разбавляли в 150 мкл подвижной фазы и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Анализ проводился в следующих условиях: хроматографическая колонка Phenomenx Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6мм) с зернением 4 мкм. Температура разделения — 35°C. Скорость потока — 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: ацетонитрил — 128 мл, вода деионизированная — 267,4 мл, кислота уксусная ледяная — 6,33 мл, триэтиламин — до значения рН=6,7. Время удерживания

фексофенадина составило 12,8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составил 1,2 – 57,4 мкМ.

Валидацию хроматографической методики выполняли по следующим параметрам: селективность, линейность (калибровочная кривая), точность, прецизионность, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность фексофенадина в транспортной среде [27; 34; 115; 126].

Параметры пригодности хроматографической системы. Число теоретических тарелок составило более 3100 (норма – не менее 2000), коэффициент асимметрии пика – не более 1,2 (норма – не более 2).

Селективность. На хроматограммах чистой транспортной среды не было обнаружено пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания фексофенадина (рисунки 6-7).

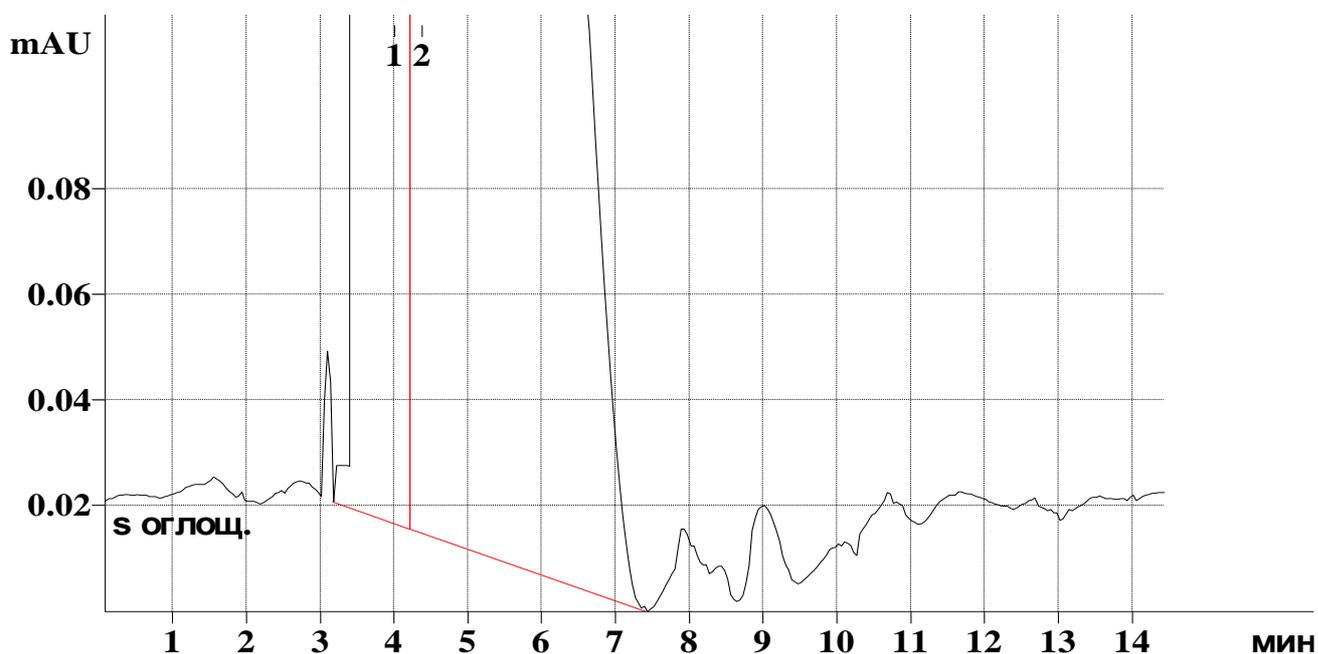


Рисунок 6 — Хроматограмма холостой транспортной среды

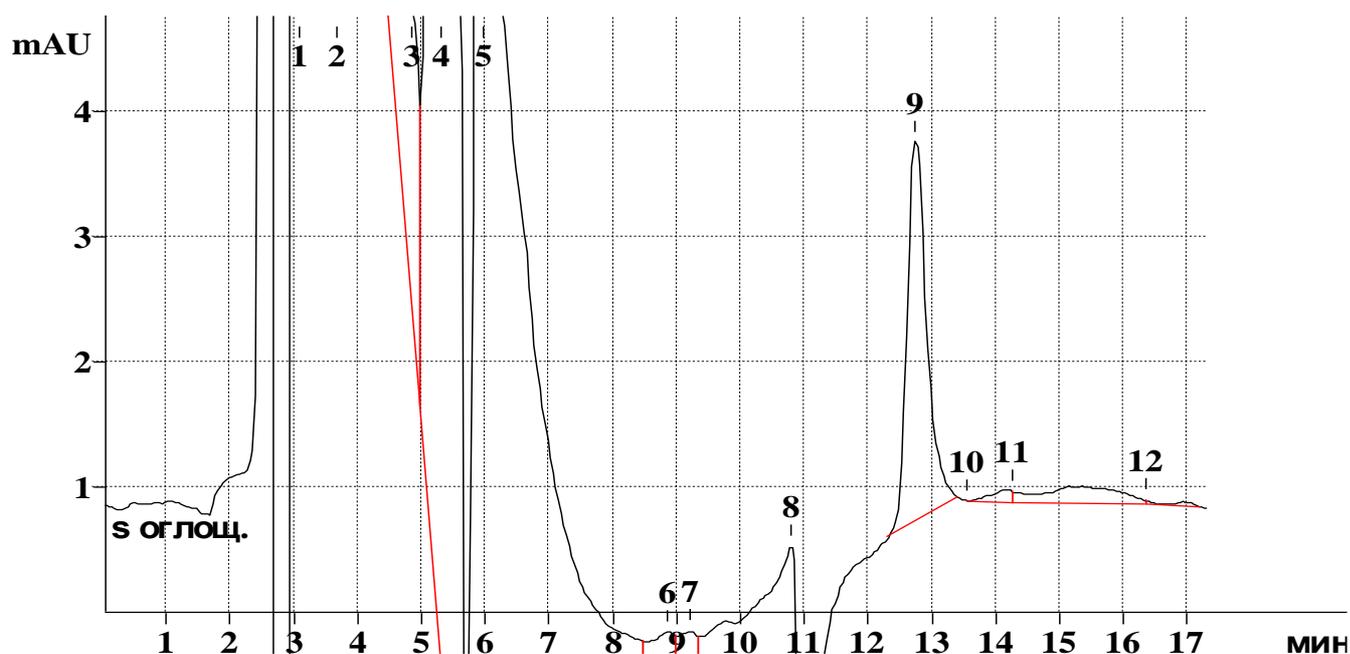


Рисунок 7 — Хроматограмма транспортной среды, содержащей 9,6 мкМ фексофенадина

Предел обнаружения фексофенадина составил 0,4 мкМ, нижний предел количественного определения фексофенадина – 1,2 мкМ. При этом точность и прецизионность определения не превышали 20%.

Калибровочные графики строили с использованием 7 стандартных растворов фексофенадина с концентрациями 1,2 мкМ, 2,4 мкМ, 4,8 мкМ, 9,57 мкМ, 19,14 мкМ, 38,27 мкМ, 57,4 мкМ. Данные растворы были приготовлены и проанализированы троекратно. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме ($y = 5,6596x - 4,4164$, $R^2 = 0,9991$; $y = 5,915x - 5,1311$, $R^2 = 0,9992$; $y = 6,1768x - 5,3598$, $R^2 = 0,9948$).

Точность и прецизионность оценивали путем анализа образцов транспортной среды с добавлением стандартных растворов фексофенадина до получения концентраций 1,2; 9,57 и 38,27 мкМ. Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) как внутрицикловые, так и межцикловые соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек)

2.2. Исследования *in vivo*

2.2.1. Тест-система

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

Содержание и уход за животными осуществлялись в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014).

Животные содержались в условиях конвенционального вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, с системой «чистого» и «грязного» коридоров и автоматической сменой дневного и ночного периода (08:00-20:00 – «день», 20:00-08:00 – «ночь»). В комнате, где содержались животные, поддерживалась температура 21-24°C, влажность 55-65%, кратность воздухообмена не менее 12.

Животные содержались по 5 особей в клетках Тип-4 (1815 см²) на подстилке. Поликарбонатные клетки оборудовались стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма, углублением для водного резервуара с поилкой и стальными держателями этикеток.

Все животные обладали ветеринарными свидетельствами, при поступлении осматривались ветеринарным врачом и проходили карантин 14 дней. В эксперимент были отобраны крысы без признаков отклонений в состоянии здоровья. Животных распределяли по группам, используя в качестве критерия массу тела таким образом, чтобы средняя масса тела животных к 1-му дню введения статистически не отличалась между группами.

Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, в соответствии с которым животному ставилась метка проколом ушной раковины.

Стандартный гранулированный корм для содержания лабораторных грызунов Комбикорм ЛБК-120 (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод») давался *ad libitum* в кормовое углубление крышки клетки.

Специально подготовленная вода Гейзер Престиж («Гейзер»), Reverse Osmosis Water Storage Pressure Tank RO-122 («Oceanic Water Systems») давалась *ad libitum* в

стандартных автоклавированных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками.

Исследование было одобрено Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол №2 от 8.11.2017).

2.2.2. Дизайн исследования

Все животные были разделены на следующие серии:

I. Первая серия – разработка методики оценки активности P_{gr} в ГЭБ:

1. *Первая группа* – интактные крысы-самцы, которым однократно внутривенно вводили фексофенадин в дозе 5 мг/кг массы тела. Через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после инъекции животных выводили из эксперимента (n=30, по 5 животных на каждую временную точку);

2. *Вторая группа* – интактные крысы-самцы, которым однократно внутривенно вводили фексофенадин в дозе 10 мг/кг [137] массы тела. Через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после инъекции животных выводили из эксперимента (n=5 на каждую временную точку);

3. *Третья группа* – интактные крысы-самцы, которым однократно внутривенно вводили фексофенадин в дозе 15 мг/кг массы тела. Через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после инъекции животных выводили из эксперимента (n=5 на каждую временную точку).

II. Вторая серия – изучение влияния ЭМГПС на активность P_{gr} в ГЭБ:

1. *Первая группа* – животные, которым однократно внутривенно вводили ЭМГПС (Мексидол[®], раствор для инъекций, 50 мг/мл, «Фармасофт», Россия) в дозе 50 мг/кг [31] массы тела и оценивали функционирование P_{gr} в ГЭБ (n=30);

2. *Вторая группа (контроль ингибирования)* – животные, которым однократно внутривенно вводили верапамил (ингибитор P_{gr} , раствор для инъекций, 2,5 мг/мл, «Биосинтез», Россия) в дозе 1,65 мг/кг [31] массы тела и оценивали функционирование P_{gr} в ГЭБ (n=30);

3. *Третья группа (контроль индукции)* – животные, которым внутрижелудочно вводили рифампицин (индуктор Pgr, капсулы, 150 мг, «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) в дозе 20 мг/кг [198] массы тела два раза в день в течение 14 дней и оценивали функционирование Pgr в ГЭБ (n=30).

III. Третья серия – изучение влияния ЭМГПС на относительное количество Pgr в ГЭБ:

1. *Первая группа* – норма, интактные крысы-самцы, которым внутрижелудочно вводили воду для инъекций («Обновление», Россия) 3 раза в сутки в течение 14 дней и оценивали относительное количество Pgr в ГЭБ (n=5).

2. *Вторая группа* – животные, которым однократно внутривенно вводили ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы тела и оценивали относительное количество Pgr в ГЭБ (n=5);

3. *Третья группа* – животные, которым внутрижелудочно вводили ЭМГПС в дозе 100 мг/кг [8] массы тела 3 раза в сутки в течение 14 дней и оценивали относительное количество Pgr в ГЭБ (n=5);

4. *Четвертая группа (контроль индукции)* – животные, которым внутрижелудочно вводили рифампицин (индуктор Pgr) в дозе 20 мг/кг массы тела два раза в день в течение 14 дней и оценивали относительное количество Pgr в ГЭБ (n=5).

IV. Четвертая серия – изучение влияния ЭМГПС на активность Pgr в ГЭБ при острой гипоксической гипобарической гипоксии:

1. *Первая группа* – контроль гипоксии, интактные крысы-самцы, которым однократно внутривенно вводили воду для инъекций, через 30 мин подвергали воздействию острой гипоксической гипобарической гипоксии и через 3 ч оценивали функционирование Pgr в ГЭБ (n=30).

2. *Вторая группа* – животные, которым однократно внутривенно вводили ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы тела, через 30 мин подвергали воздействию острой гипоксической гипобарической гипоксии и через 3 ч оценивали функционирование Pgr в ГЭБ (n=30).

V. Пятая серия – изучение влияния ЭМГПС на относительное количество Pgr в ГЭБ при острой гипоксической гипобарической гипоксии:

1. *Первая группа* – контроль гипоксии, интактные крысы-самцы, которым однократно внутривенно вводили воду для инъекций, через 30 мин подвергали воздействию острой гипоксической гипобарической гипоксии и через 3 ч оценивали относительное количество Pgr в ГЭБ (n=5).

2. *Вторая группа* – животные, которым однократно внутривенно вводили ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы тела, через 30 мин подвергали воздействию острой гипоксической гипобарической гипоксии и через 3 ч оценивали относительное количество Pgr в ГЭБ (n=5).

VI. Шестая серия – изучение влияния ЭМГПС на относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 и выраженность окислительного стресса в коре лобной доли больших полушарий головного мозга крыс:

1. *Первая группа* – норма, интактные животные, которым внутрижелудочно вводили воду для инъекций 3 раза в сутки в течение 14 дней и оценивали относительное количество HIF-1 α и Nrf2 и выраженность окислительного стресса в коре лобной доли больших полушарий головного мозга (n=5);

2. *Вторая группа* – животные, которым внутрижелудочно вводили ЭМГПС в дозе 100 мг/кг массы тела 3 раза в сутки в течение 14 дней и определяли относительное количество HIF-1 α и Nrf2 и выраженность окислительного стресса в коре лобной доли больших полушарий головного мозга (n=5);

3. *Третья группа* – животные, которым однократно внутрибрюшинно вводили ЭМГПС в дозе 120 мг/кг [66] массы тела и определяли относительное количество HIF-1 α и Nrf2 и выраженность окислительного стресса в коре лобной доли больших полушарий головного мозга (n=5);

4. *Четвертая группа* – животные, которым внутрижелудочно вводили дистиллированную воду 3 раза в сутки в течение 14 дней и подвергали воздействию острой гипоксической гипобарической гипоксии, а затем определяли

относительное количество HIF-1 α и Nrf2 и выраженность окислительного стресса в коре лобной доли больших полушарий мозга (n=5).

5. *Пятая группа* – животные, которым внутрижелудочно вводили ЭМГПС в дозе 100 мг/кг массы тела 3 раза в сутки в течение 14 дней [8], подвергали воздействию острой гипоксической гипобарической гипоксии, а затем определяли относительное количество HIF-1 α и Nrf2 и выраженность окислительного стресса в коре лобной доли больших полушарий мозга (n=5).

2.2.3. Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии у крыс Wistar

Гипоксию моделировали подъемом животных в барокамере на высоту 8000 м со скоростью 50 м/с, экспозицией в течение 30 мин (без учёта времени подъёма и спуска) и спуском со скоростью 50 м/с. Данная модель наиболее часто применяется для оценки антигипоксической активности фармакологических средств [4]. Через 3 ч после моделирования гипоксии животных выводили из эксперимента.

2.2.4. Метод оценки активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере коры больших полушарий головного мозга крыс

Принцип метода оценки активности Pgp в ГЭБ лобной доли коры больших полушарий головного мозга крыс заключается в определении степени проникновения маркерного субстрата белка-транспортера в ткань мозга после внутривенного введения. Выбор внутривенного способа введения обусловлен тем, что при нем биодоступность лекарственных веществ составляет 100%.

В качестве маркерного субстрата Pgp использовали фексофенадин. Фексофенадин вводили крысам внутривенно в дозе 10 мг/кг массы тела и через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин животных подвергали эвтаназии.

Для анализа у животных забирали кровь в объеме 4 мл из брюшной аорты в гепаринизированные пробирки, а также 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.

Количественное определение фексофенадина в плазме крови крыс и в гомогенате головного мозга производили методом ВЭЖХ с УФ-детектором по оригинальным разработанным методикам, подробное описание и валидация которых представлены далее в разделе «результаты».

Суммарное количество фексофенадина, попавшего в системный кровоток и в кору больших полушарий, оценивали по площади под кривой концентрация фексофенадина (в крови или ткани коры больших полушарий головного мозга) – время (AUC_{0-t} плазма или AUC_{0-t} мозг), которые рассчитывали по методу трапеций [15].

Для оценки проницаемости ГЭБ был рассчитан показатель AUC_{0-t} мозг / AUC_{0-t} плазма [102].

2.2.5. Метод оценки относительного количества гликопротеина-P, транскрипционных факторов Nrf2, HIF-1 α в коре больших полушарий головного мозга

Относительное количество Pgp в ГЭБ, а также транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α в коре больших полушарий головного мозга оценивали иммуногистохимически. Для этого животных выводили из эксперимента введением летальной дозы золетила («Золетил 100», «Virbac С.А.», Франция) в количестве 30 мг/кг массы тела. Для анализа забирали образцы лобной доли головного мозга крыс, фиксировали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина и после процедуры обезвоживания заливали в парафин. Перед иммуногистохимической реакцией проводили демаскировку антигенов нагреванием в 10 мМ цитратном буфере (pH=6) в течение 20 мин при 100°C , осуществляли пероксидазный блок (обработка 3% раствором пероксида водорода в течение 5 мин при комнатной температуре) и протеиновый блок (обработка 0,4% раствором казеина в течение 5 мин при комнатной температуре). Затем инкубировали срезы с первичными антителами к Pgp (Mdr-1 3H2833: sc-71557 «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 H₂O₂ («Дако», Дания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином [2; 154].

Микропрепараты фотографировали с помощью цифровой камеры ЛОМО ТС-500 (Россия) при увеличении в 400 раз. С каждого гистологического препарата делали фотографии 10 репрезентативных участков.

Анализ изображения осуществляли с помощью медицинской программы для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ (США). С помощью плагина Colour Deconvolution изображение разделяли на слой, окрашенный диаминобензидином, и слой, окрашенный гематоксилином [121]. По данным литературы некорректное разделение наблюдается лишь у 2,4% пикселей [205].

Относительное количество белка Pgp в гематоэнцефалическом барьере 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.

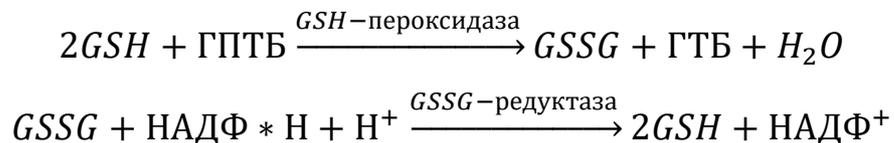
2.2.6. Оценка выраженности окислительного стресса

Для оценки выраженности окислительного стресса в коре лобной доли больших полушарий головного мозга крыс, образец ткани мозга гомогенизировали при +2 °С в 0,05 М изотоническом фосфатном буфере с pH=7,4, с использованием роторного высокоскоростного гомогенизатора DIAХ 900 (насадка 6G), со скоростью 24000 об/мин в течение 60 сек. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут (Т = +2°С). В полученном супернатанте определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА), небелковых тиоловых (SH) групп, активность Se-зависимой глутатионпероксидазы (G-per) и глутатион-S-трансферазы (G-tr).

Содержание МДА определяли по методу R. Noss в модификации Н.Д. Стальной и Т.Г. Горишвили [43]. Метод основан на способности конечного продукта окисления липидов – МДА – реагировать с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), с образованием окрашенного комплекса, который имеет максимум поглощения при 532 нм [43].

Концентрацию SH-групп определяли в ходе реакции восстановления дисульфид-5,5-дитиобис-2-нитробензоата (ДТНБ), растворённого в абсолютном этаноле (реагент Элмана – G.L. Ellman [107]) с образованием эквивалентного количества окрашенных жёлтых анионов 2-нитро-5-тиобензоата. Белки осаждали абсолютным этанолом [107].

Активность G-per определяли в сопряженной системе по уменьшению концентрации НАДФ*Н₂ [21; 188]:



Активность глутатион-S-трансферазы оценивали по увеличению оптической плотности опытного образца при длине волны 340 нм в результате реакции конъюгации глутатиона и 1-хлор-2,4-динитробензола (ХДНБ) и образования окрашенного продукта [146].

2.2.7. Статистическая обработка полученных результатов

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «StatSoft Statistica 13.0» и «Microsoft Office Excel» 2017.

Характер распределения данных, полученных в ходе исследований, оценивали по критерию Шапиро-Уилка. В случае, если распределение данных было нормальным, использовался дисперсионный анализ (ANOVA); попарные сравнения выполняли по критерию Ньюмана-Кейлса. При распределении данных, отличном от нормального, был использован критерий Крускала-Уоллиса для несвязанных выборок. Парные 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 виде среднего арифметического и стандартного отклонения при нормальном распределении данных, либо в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей в случае отличного от нормального распределения данных [33; 36].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на активность гликопротеина-P *in vitro*

Влияние ЭМГПС на активность Pgp анализировалось в экспериментах *in vitro* на клетках линии Caco-2 по трансмембранному транспорту субстрата белка-транспортера – фексофенадина. Оценка активности Pgp проводилась после предварительной инкубации культуры клеток с исследуемым тест-препаратом в течение 30 минут, что позволяет оценить его прямое действие на молекулу транспортёра. Рассчитывали коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную ($P_{app\ b\rightarrow a}$, обусловлен работой Pgp и пассивной диффузией), коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина из апикальной камеры в базолатеральную ($P_{app\ a\rightarrow b}$, обусловлен простой диффузией против работы Pgp), а также их отношение ($P_{app\ b\rightarrow a}/P_{app\ a\rightarrow b}$), характеризующее асимметрию транспорта.

В интактных клетках Caco-2 значение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a}$ составило $2,97*10^{-6}\pm 1,32*10^{-6}$ см/сек, $P_{app\ a\rightarrow b} = 0,61*10^{-6}\pm 0,21*10^{-6}$ см/сек, а их отношение $P_{app\ b\rightarrow a}/P_{app\ a\rightarrow b} = 4,73\pm 1,04$.

Значение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a}/P_{app\ a\rightarrow b}$, 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 снижал отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a}/P_{app\ a\rightarrow b}$: в концентрации 50 мкмоль/л — на 40,6% ($p=0,058$), в концентрации 100 мкмоль/л — на 49,7% ($p=0,038$), а в концентрации 200 мкмоль/л — на 64,1% ($p=0,017$) по сравнению с показателями контроля, что свидетельствует об ингибировании активности белка-транспортера (таблица 2).

Таблица 2 — Влияние верапамила на транспорт фексофенадина через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2 (M±SD)

Концентрация верапамила	Параметры		
	$P_{app\ b\rightarrow a}$, см/сек	$P_{app\ a\rightarrow b}$, см/сек	$\frac{P_{app\ b\rightarrow a}}{P_{app\ a\rightarrow b}}$
Норма	$2,97 \times 10^{-6} \pm 1,32 \times 10^{-6}$	$0,61 \times 10^{-6} \pm 0,21 \times 10^{-6}$	$4,73 \pm 1,04$
1 мкмоль/л	$3,55 \times 10^{-6} \pm 1,04 \times 10^{-6}$	$0,76 \times 10^{-6} \pm 0,26 \times 10^{-6}$	$4,77 \pm 0,55$
10 мкмоль/л	$3,2 \times 10^{-6} \pm 0,50 \times 10^{-6}$	$0,85 \times 10^{-6} \pm 0,31 \times 10^{-6}$	$4,0 \pm 1,56$
50 мкмоль/л	$1,47 \times 10^{-6} \pm 0,25 \times 10^{-6}$	$0,55 \times 10^{-6} \pm 0,2 \times 10^{-6}$	$2,81 \pm 0,69^*$
100 мкмоль/л	$1,15 \times 10^{-6} \pm 0,4 \times 10^{-6}$	$0,51 \times 10^{-6} \pm 0,16 \times 10^{-6}$	$2,38 \pm 0,83^*$
200 мкмоль/л	$1,23 \times 10^{-6} \pm 0,19 \times 10^{-6}$	$0,85 \times 10^{-6} \pm 0,45 \times 10^{-6}$	$1,71 \pm 0,82^*$

Примечание: * - $p < 0,05$ – достоверные различия с показателями нормы

ЭМГПС в концентрации 100 мкмоль/л повышал коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app\ a\rightarrow b}$ фексофенадина на 152,5% ($p=0,024$), а в концентрации 200 мкмоль/л – на 375,4% ($p=0,001$) по сравнению со значениями контроля. При этом отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a} / P_{app\ a\rightarrow b}$ фексофенадина уменьшалось при концентрации ЭМГПС 100 мкмоль/л – на 53,5% ($p=0,026$), при концентрации 200 мкмоль/л – на 87,3% ($p=0,002$) по сравнению с контролем (таблица 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ЭМГПС в опытах *in vitro* снижает активность белка-транспортера Pgp.

Сравнение ингибирующей активности ЭМГПС и верапамила показало, что при концентрации веществ 50 мкмоль/л коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a}$ фексофенадина при использовании верапамила был ниже, чем при использовании ЭМГПС на 56,8% ($p=0,004$).

Таблица 3 — Влияние ЭМГПС на транспорт фексофенадина через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 (M±SD)

Концентрация ЭМГПС	Параметры		
	$P_{app\ b\rightarrow a}$, см/сек	$P_{app\ a\rightarrow b}$, см/сек	$\frac{P_{app\ b\rightarrow a}}{P_{app\ a\rightarrow b}}$
Норма	$2,97 \times 10^{-6} \pm 1,32 \times 10^{-6}$	$0,61 \times 10^{-6} \pm 0,21 \times 10^{-6}$	$4,73 \pm 1,04$
1 мкмоль/л	$4,2 \times 10^{-6} \pm 0,3 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6} \pm 0,27 \times 10^{-6}$	$3,94 \pm 0,75$
10 мкмоль/л	$4,58 \times 10^{-6} \pm 0,61 \times 10^{-6}$	$1,57 \times 10^{-6} \pm 1,5 \times 10^{-6}$	$3,37 \pm 1,74$
50 мкмоль/л	$3,4 \times 10^{-6} \pm 0,3 \times 10^{-6} \#$	$0,95 \times 10^{-6} \pm 0,27 \times 10^{-6}$	$3,27 \pm 0,43$
100 мкмоль/л	$3,2 \times 10^{-6} \pm 0,36 \times 10^{-6} \#$	$1,54 \times 10^{-6} \pm 0,4 \times 10^{-6} * \#$	$2,2 \pm 0,69 *$
200 мкмоль/л	$1,73 \times 10^{-6} \pm 0,18 \times 10^{-6} \#$	$2,9 \times 10^{-6} \pm 0,29 \times 10^{-6} * \#$	$0,6 \pm 0,12 *$

Примечание: * - $p < 0,05$ – достоверные различия с показателями нормы
- $p < 0,05$ – достоверные различия между сериями ЭМГПС и верапамила

При концентрациях 100 и 200 мкмоль/л коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a}$ фексофенадина при применении верапамила был ниже соответствующих значений при использовании ЭМГПС на 64,1% и 28,9% ($p < 0,05$), а коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app\ a\rightarrow b}$ был ниже на 66,9% и 70,7% ($p < 0,05$) соответственно. Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a} / P_{app\ a\rightarrow b}$ достоверно между экспериментальными группами не различалось.

При расчете IC50 и оценке динамики изменения отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b\rightarrow a} / P_{app\ a\rightarrow b}$ фексофенадина было показано, что данные параметры достоверно не различались при применении ЭМГПС и верапамила ($p > 0,05$) (рисунки 8, 9).

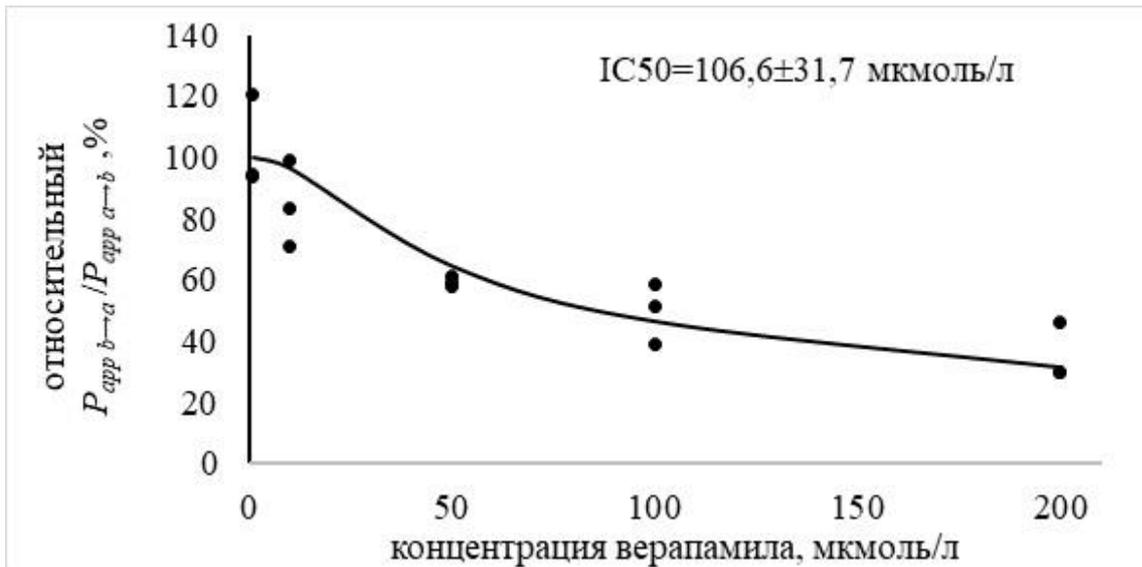


Рисунок 8 — Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b \rightarrow a} / P_{app\ a \rightarrow b}$ фексофенадина под действием верапамила

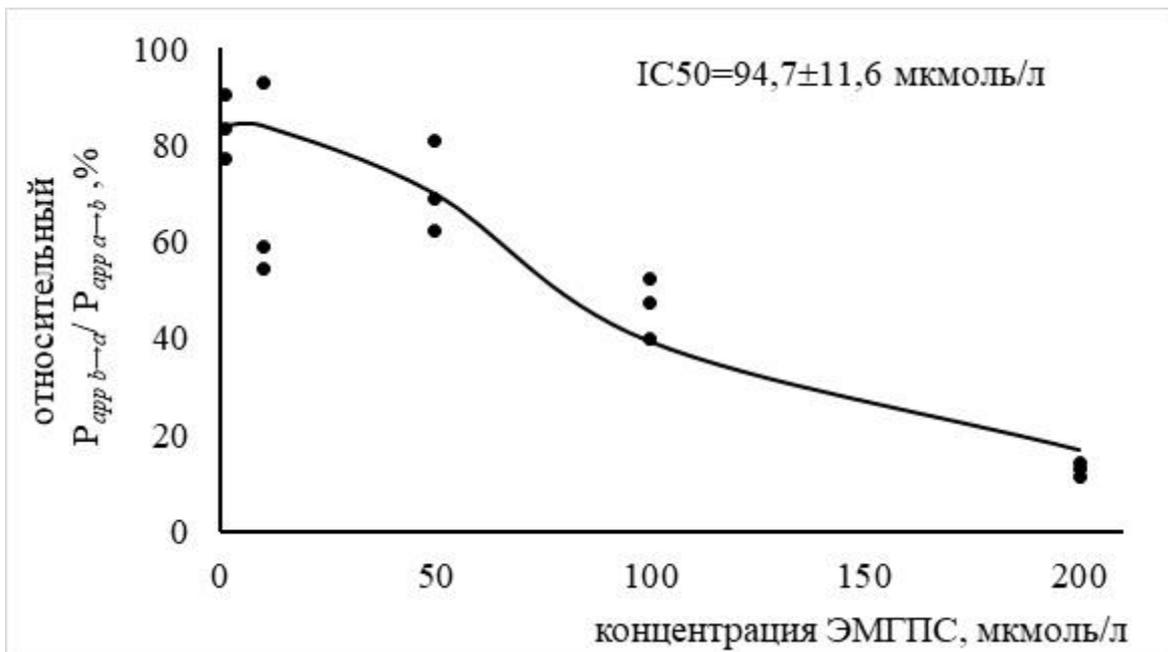


Рисунок 9 — Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app\ b \rightarrow a} / P_{app\ a \rightarrow b}$ под действием этилметилгидроксипиридина сукцината

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

3.2. Разработка методики оценки активности гликопротеина-P в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс

Принцип метода оценки активности Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс заключается в тестировании проникновения маркерного субстрата белка-транспортера (в настоящем исследовании в качестве маркерного субстрата использовали фексофенадин) в ткань мозга после его внутривенного введения.

В связи с отсутствием лекарственной формы фексофенадина для парентерального введения производился перевод его таблетированной формы (Аллегра[®], 180 мг, Sanofi-Aventis, США) в форму для инъекционного введения следующим образом: 1 таблетка измельчалась и суспендировалась в 20 мл ацетонитрила категории «Для ВЭЖХ», после чего взбалтывалась на приборе Shaker в течение 15 мин с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 1750 g. Надосадочный слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе и сухой остаток растворяли в 10 мл воды для инъекций. Полученный раствор стерилизовали методом фильтрации через фильтрационную насадку с диаметром пор 0,22 мкм («Corning», США), а затем в нем определяли концентрацию фексофенадина методом ВЭЖХ-УФ. Раствор субстрата Pgp вводили в хвостовую вену крыс в дозе 10 мг/кг (2 мл/кг) массы тела и через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин животных подвергали эвтаназии.

Для анализа у животных забирали кровь в объеме 4 мл из брюшной аорты в гепаринизированные пробирки, а также кору больших полушарий головного мозга. Кровь центрифугировали при 1750 g 10 мин для получения плазмы. Образцы тканей и плазмы замораживали при -80°C до последующего анализа.

Для экстракции фексофенадина из плазмы крови к 1,5 мл плазмы прибавляли 4 мл ацетонитрила («ACROS ORGANICS», Бельгия) категории «Для ВЭЖХ», встряхивали на приборе Shaker («Elmi», Латвия) при 400 об/мин в течение 15 мин и центрифугировали 15 мин при 1500 g, после чего упаривали надосадочную жидкость при 50°C на роторно-вакуумном испарителе Heidolph (Германия) до состояния сухого остатка. Полученный остаток растворяли в 300 мкл подвижной

фазы с использованием вибрационного встряхивателя Vortex («Heidolph», Германия).

Поскольку степень проникновения фексофенадина в головной мозг достаточно низкая, то при разработке методики его анализа в ткани мозга было решено использовать неэкстрактивный метод пробоподготовки. Подготовку образца коры головного мозга к хроматографическому анализу осуществляли следующим способом: 500 мг образца ткани после добавления 500 мкл воды деионизированной гомогенизировали в течение 1 мин на турбинном гомогенизаторе D1AX 900 (насадка 6G) при 24000 об/мин. Полученный гомогенат смешивали с 4 мл ацетонитрила и встряхивали в течение 15 мин с последующим центрифугированием при 1750 g на протяжении 15 мин. После центрифугирования надосадок упаривали на роторно-вакуумном испарителе до получения сухого остатка, который в последующем растворяли в 300 мкл подвижной фазы с использованием вибромешалки. Полученный раствор в дальнейшем центрифугировали при 1750 g в течение 5 мин, надосадочную жидкость анализировали методом ВЭЖХ-УФ.

Данный метод был выбран для исключения стадии экстракции из водной фазы в органическую, как в случае с плазмой крови, поскольку при экстракции происходят потери исследуемых веществ, что является крайне нежелательным при анализе образцов мозга. Ацетонитрил осаждает макромолекулярные органические соединения, в нём хорошо растворяется исследуемое соединение, и он прекрасно смешивается с водной частью клеток и тканей.

Количественное определение фексофенадина в плазме крови и в гомогенате головного мозга крыс производили методом ВЭЖХ с колонкой Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6) с зернением 4 мкм и термостатированием при 35°C на хроматографической системе «Stayer» с УФ-спектрофотометрическим детектированием при длине волны 220 нм. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила («ACROS ORGANICS», Бельгия, «Для ВЭЖХ»), 267,4 мл воды деионизированной, 7,0 мл триэтиламина («ACROS ORGANICS», Бельгия, «Для ВЭЖХ»), 4,66 мл кислоты уксусной ледяной («ХИММЕД», Россия), pH=6,0.

Скорость потока – 1 мл/мин. Время удерживания фексофенадина составило $14,91 \pm 0,25$ мин. Коэффициенты экстракции фексофенадина из плазмы крови крыс и гомогената коры головного мозга составили 83,57% и 81,25% соответственно.

Валидацию хроматографических методик выполняли по следующим параметрам: селективность; калибровочная кривая (линейность); точность; прецизионность; нижний предел количественного определения; перенос пробы; стабильность фексофенадина в плазме и гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс.

Параметры пригодности хроматографической системы. Число теоретических тарелок составило более 3100 (норма – не менее 2000), коэффициент асимметрии пика – не более 1,4 (норма – не более 2).

Селективность. На хроматограммах холостой плазмы крови и холостого гомогената лобной доли коры больших полушарий головного мозга крыс не было обнаружено пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания фексофенадина (рисунки 10-13).

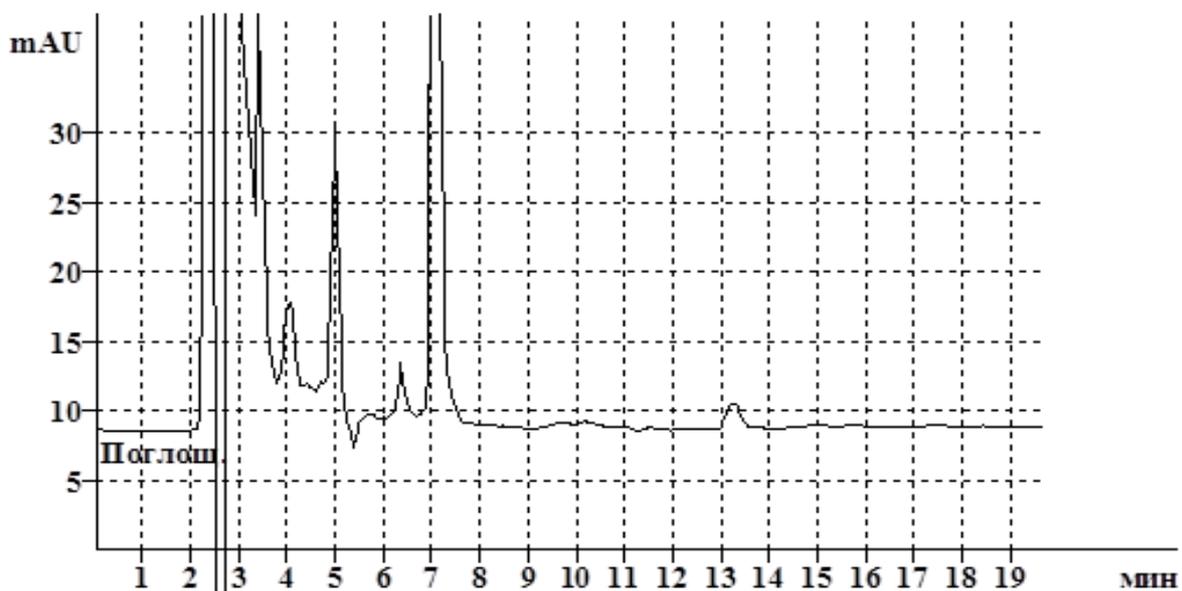


Рисунок 10 — Хроматограмма холостого образца плазмы крови

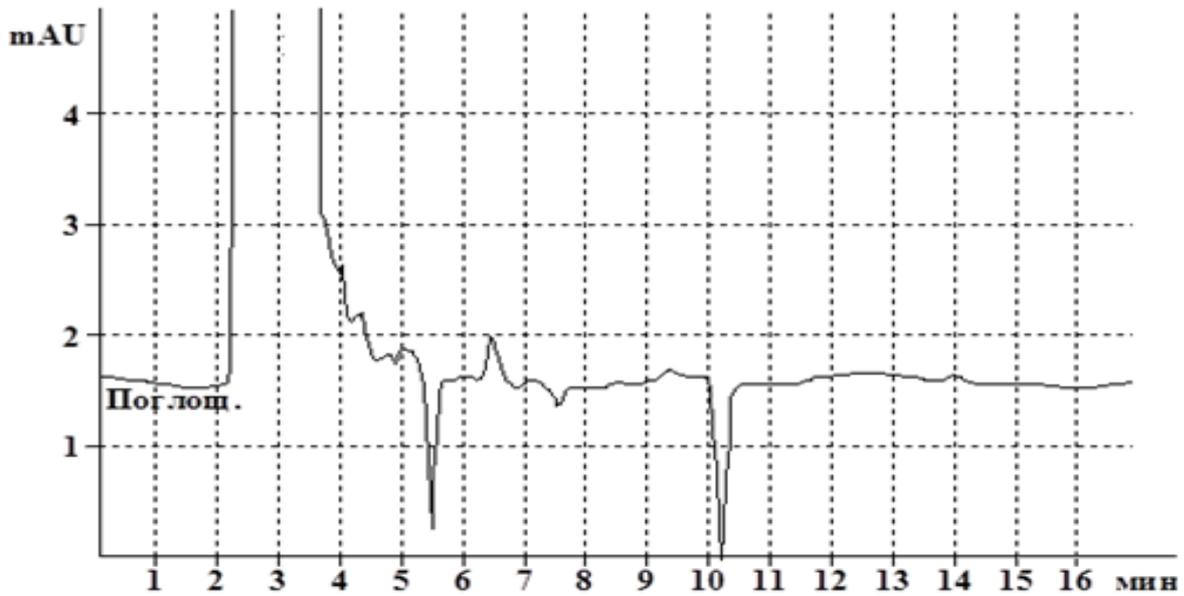


Рисунок 11 — Хроматограмма холостого образца гомогената мозга

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.

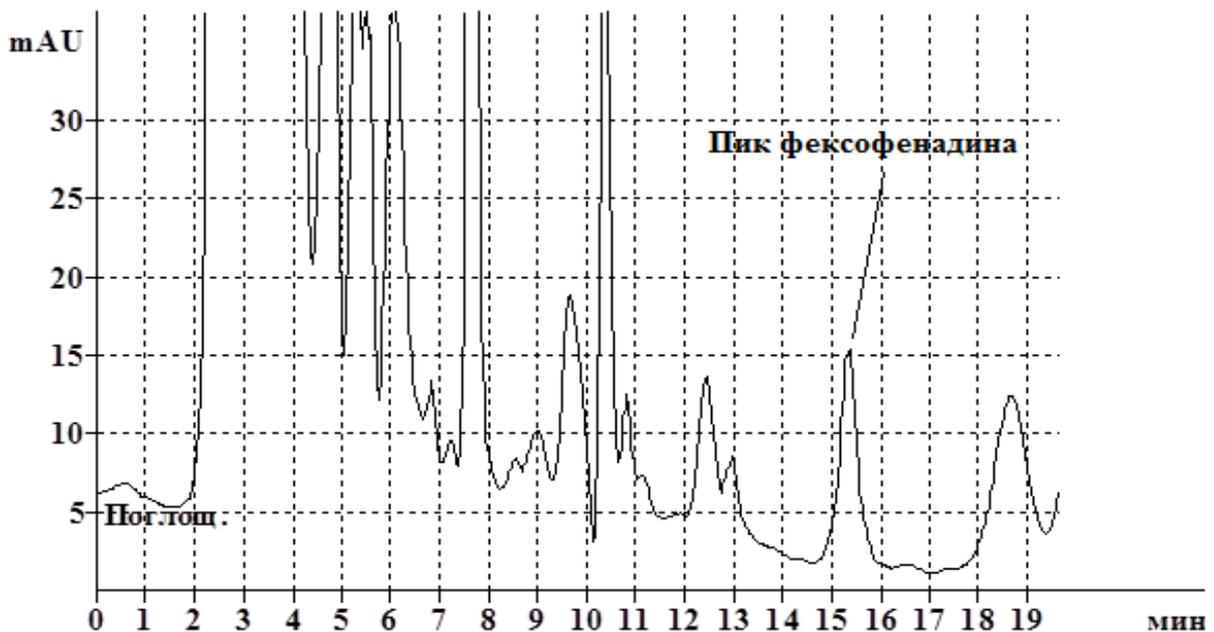


Рисунок 12 — Хроматограмма холостого образца плазмы крови с добавлением фексофенадина до концентрации 100 нг/мл

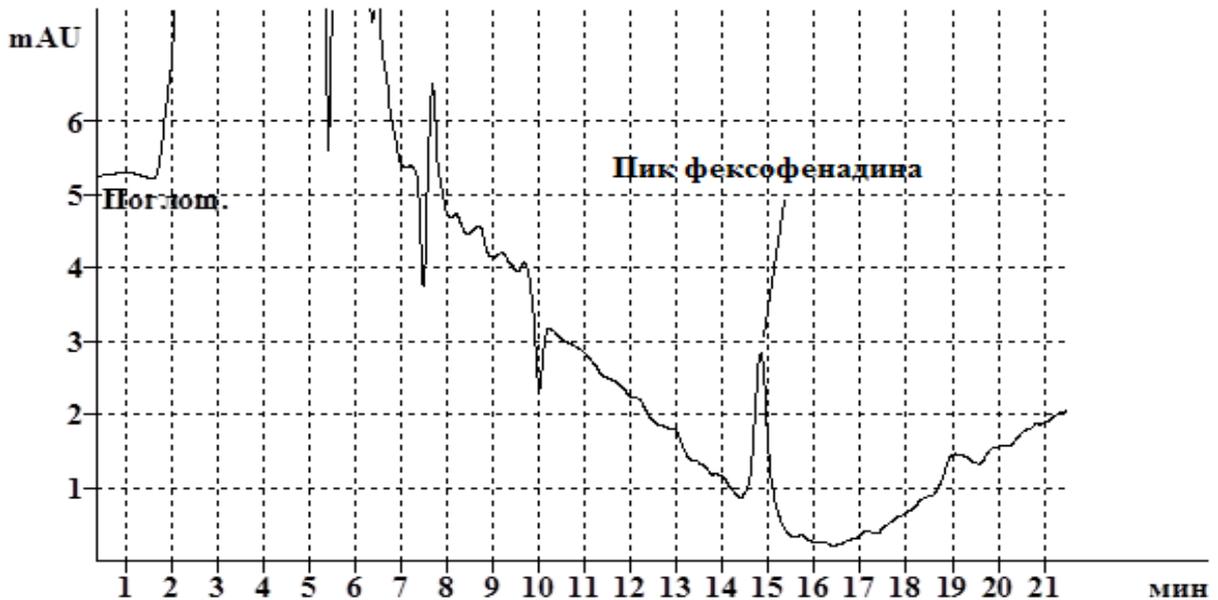


Рисунок 13 — Хроматограмма холостого образца гомогената мозга с добавлением фексофенадина до концентрации 500 нг/г ткани

Калибровочная кривая. Анализировали образцы холостой плазмы крови с добавлением фексофенадина до получения следующих концентраций: 100 нг/мл, 400 нг/мл, 800 нг/мл, 1000 нг/мл, 2000 нг/мл, 10000 нг/мл. По полученным значениям были построены три калибровочных графика зависимости площади пика фексофенадина от концентрации фексофенадина в плазме крови.

Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме ($y = 4,9480 x - 18,7937$, $R^2 = 0,9999$; $y = 5,018 x - 16,2208$, $R^2 = 0,9998$; $y = 4,9751 x - 0,5955$, $R^2 = 0,9996$).

Для построения калибровочных кривых зависимости площади пика фексофенадина от концентрации фексофенадина в гомогенате коры мозга было использовано 6 стандартных смесей фексофенадина с интактной тканью с концентрациями 50, 250, 500, 750, 1000, 2000 нг/г ткани. Данные растворы были приготовлены и проанализированы троекратно. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме ($y = 14,673x - 24,008$, $R^2 = 0,9991$; $y = 14,364 x - 24,162$, $R^2 = 0,9990$; $y = 14,506 x - 31,007$, $R^2 = 0,9983$).

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнениям линейной зависимости, от номинальных значений, соответствовали

принятой норме (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек).

Точность и прецизионность. Проводили анализ холостых образцов плазмы крови или гомогената мозга с добавленным стандартом фексофенадина. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность). Полученные величины прецизионности и точности соответствовали нормам (не более 20% на уровне нижнего предела количественного определения, не более 15% – для остальных точек). Результаты представлены в таблицах 4-7.

Стабильность. Для оценки стабильности фексофенадина в плазме крови и гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс при хранении в замороженном состоянии готовили образцы, аналогичные по составу образцам калибровочных растворов с концентрацией 2000 нг/мл и 2000 нг/г соответственно. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные – после хранения в замороженном состоянии в течение 60 суток. Исследовали по 3 независимых образца. Рассчитанные концентрации фексофенадина до и после заморозки статистически значимо не различались.

Перенос пробы. При последовательном анализе контрольного образца плазмы с концентрацией фексофенадина 10000 нг/мл и образца холостой плазмы крови, а также образца гомогената мозга с концентрацией фексофенадина 2000 нг/г и образца холостой пробы на хроматограммах холостых образцов отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пику фексофенадина, что свидетельствует об отсутствии переноса пробы.

Таким образом, разработанные ВЭЖХ-методики количественного определения фексофенадина в плазме крови и гомогенате коры головного мозга крыс обладают необходимой чувствительностью, селективностью, воспроизводимостью, точностью и прецизионностью и могут быть использованы для дальнейших исследований.

Таблица 4 — Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в плазме крови внутри цикла

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
100,0	90,19	9,81	89,94	10,06	2,26	2,51
	92,07	7,93				
	87,57	12,43				
400,0	372,87	6,78	383,52	4,12	11,30	2,95
	395,38	1,16				
	382,32	4,42				
2000,0	1926,40	3,68	1864,12	6,79	84,49	4,53
	1898,01	5,10				
	1767,95	11,60				

Таблица 5 — Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в плазме крови между циклами

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
100,0	89,94	10,06	97,82	2,18	8,17	8,35
	97,26	2,74				
	106,26	6,26				
400,0	383,52	4,12	374,77	6,31	13,13	3,50
	381,11	4,72				
	359,67	10,08				
2000,0	1864,12	6,79	1835,05	8,25	39,31	2,14
	1790,33	10,48				
	1850,69	7,47				

Таблица 6 — Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в гомогенате мозга внутри цикла

Концентрация номинальная, нг/г	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
50	47,33	5,35	43,99	12,02	1,41	3,21
	43,12	13,76				
	41,52	16,95				
250	268,65	7,46	272,43	8,97	4,18	1,53
	271,71	8,69				
	276,92	10,77				
500	487,43	2,51	472,03	5,59	26,94	5,71
	487,74	2,45				
	440,92	11,82				
2000	2105,61	5,28	2085,56	4,28	24,34	1,17
	2092,60	4,63				
	2058,48	2,92				

Таблица 7 — Точность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в гомогенате мозга между циклами

Концентрация номинальная, нг/г	Концентрация расчитанная, нг/мл	Точность, %	Среднее, нг/мл	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
50	49,36	16,95	41,34	17,32	0,79	1,91
	47,66	19,05				
	41,52	15,96				
250	272,43	8,97	276,72	10,69	4,85	1,75
	281,98	12,79				
	275,76	10,31				
500	472,03	5,59	476,96	4,61	8,98	1,88
	471,54	5,69				
	487,32	2,54				
2000	2085,56	4,28	2089,37	4,47	32,41	1,55
	2123,52	6,18				
	2059,04	2,95				

На следующем этапе разработки методики оценки активности Pgr в ГЭБ была оценена фармакокинетика фексофенадина после его внутривенного введения крысам Wistar в разных дозах — 5, 10 и 15 мг/кг массы тела.

После введения фексофенадина в дозе 5 мг/кг массы тела максимальная концентрация наблюдалась через 5 мин после введения и составляла 5,1 мкг/мл, а далее постепенно снижалась к 60 мин до уровня 0,59 мкг/мл (рисунок 14). Пробы, в которых концентрация фексофенадина превышала верхний предел количественного определения, анализировались повторно после необходимого разведения.

Концентрация фексофенадина в плазме крови крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы тела через 5 мин составила 16,6 мкг/мл, затем постепенно снижалась и достигала значения 1,0 мкг/мл к 60 мин эксперимента (рисунок 14).

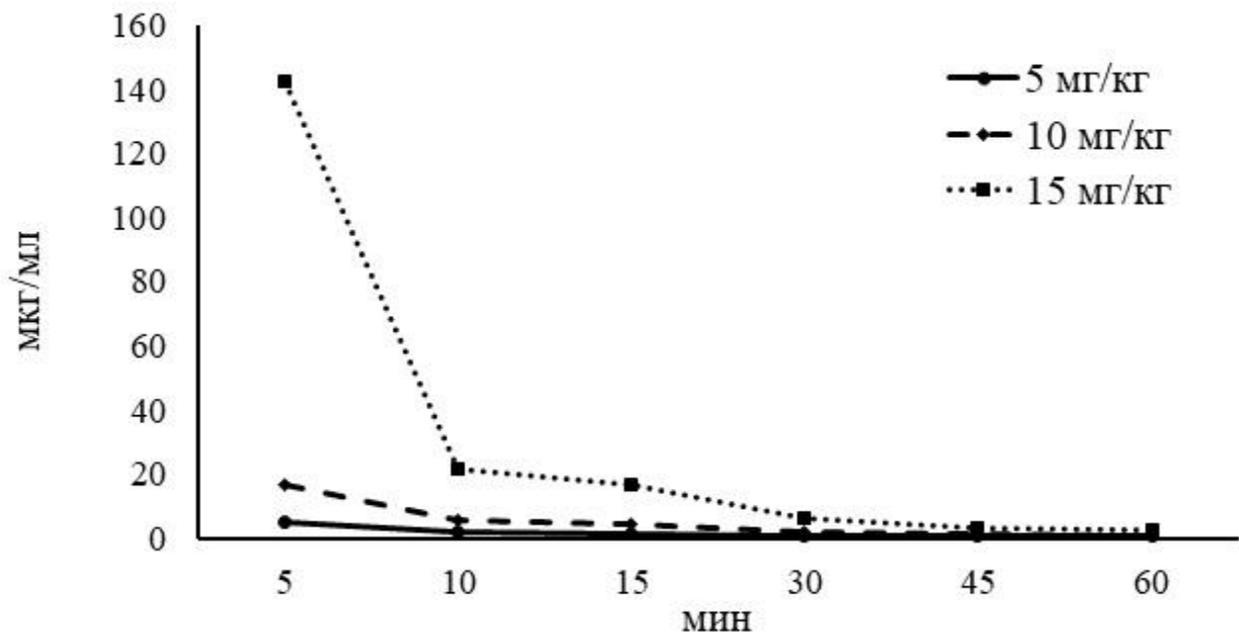


Рисунок 14 — Динамика концентраций фексофенадина в плазме крови после его внутривенного введения в дозах 5, 10 и 15 мг/кг массы тела (n=5 на каждую временную точку)

При введении фексофенадина в дозе 15 мг/кг массы максимальная концентрация наблюдалась через 5 мин – 142,7 мкг/мл, затем резко снижалась к 10 мин до 21,51 мкг/мл и продолжала дальше снижаться, достигая к 60 мин значения 2,4 мкг/мл (рисунок 14).

Концентрации фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс после его внутривенного введения в дозах 5, 10 и 15 мг/кг массы тела представлены в таблице 8.

Таблица 8 — Концентрация фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс (нг/г ткани) после его внутривенного введения в дозах 5, 10 и 15 мг/кг (медиана, верхний и нижний квартили, n=5 на каждую временную точку)

Доза фексофенадина	Временная точка					
	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
5 мг/кг массы	379,6 (НПКО; 396,3)	НПКО	213,5 (НПКО; 526,5)	80,9 (НПКО; 109,9)	НПКО	НПКО
10 мг/кг массы	264,00 (198,98; 471,35)	288,27 (202,98; 754,8)	344,77 (245,99; 432,36)	301,68 (120,85; 638,02)	242,91 (201,78; 385,01)	172,16 (147,5; 192,28)
15 мг/кг массы	3545,9 (2938,9; 3736,4)	12765,0 (4407,0; 20544,6)	144,65 (115,6; 212,6)	395,1 (145,1; 442,1)	137,9 (131,2; 157,9)	191,7 (99,04; 284,7)

Примечание: НПКО – ниже предела количественного определения

При внутривенном введении фексофенадина в дозе 5 мг/кг массы тела его концентрация в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс в большинстве случаев была ниже предела количественного определения (НПКО).

Концентрация фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга крыс через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы тела составила 264,0 нг/г ткани, достигала через 15 мин своего максимума – 344,8 нг/г ткани и постепенно снижалась к 60 мин исследования до 172,2 нг/г ткани.

После введения фексофенадина в дозе 15 мг/кг массы тела, он детектировался в гомогенате коры головного мозга крыс уже через 5 мин после введения (3545,9 нг/г ткани), достигал своего максимума (12765,0 нг/г ткани) к 10 мин, а затем его содержание резко снижалось к 15 мин и оставалось на данном уровне до конца исследования (60 мин после введения).

Таким образом, оптимальной дозой фексофенадина для оценки активности Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс является доза 10 мг/кг массы тела при внутривенном введении.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Черных И. В., Шулькин А. В., Мыльников П. Ю. и др. Метод анализа функциональной активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере // Нейрохимия. – 2019. – Т. 36. – №. 1. – С. 84-88.

3.3. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на активность гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере коры больших полушарий головного мозга крыс

Активность Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс оценивали по проникновению в ткань мозга субстрата белка-транспортера – фексофенадина – после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы тела.

ЭМГПС вводили животным однократно внутривенно в дозе 50 мг/кг массы тела. В качестве препаратов сравнения использовали классический индуктор Pgr, рифампицин, который вводили внутрижелудочно в дозе 20 мг/кг массы тела в течение

14 суток, и классический ингибитор белка-транспортера, верапамил, который вводили однократно внутривенно в дозе 1,65 мг/кг массы тела.

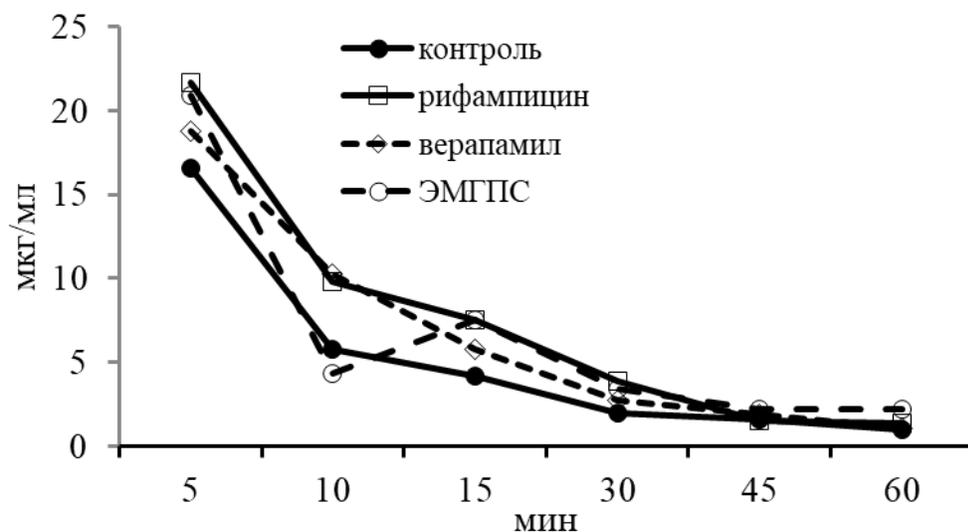


Рисунок 15 — Динамика концентраций фексофенадина в контроле и при использовании рифампицина, верапамила и ЭМГПС перед внутривенным введением фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы (n=5 на каждую временную точку)

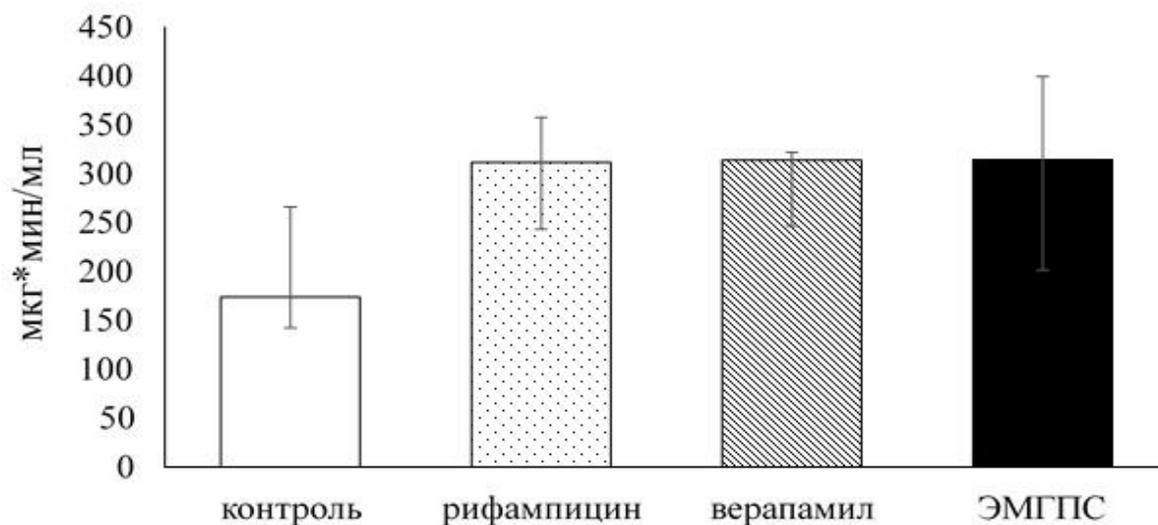


Рисунок 16 — Изменение $AUC_{0-t-плазма}$ фексофенадина в контроле и при использовании рифампицина, верапамила и ЭМГПС перед внутривенным введением фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы (медиана, верхний и нижний квартили)

Введение ЭМГПС, рифампицина и верапамила существенно не влияло на концентрацию фексофенадина в плазме крови крыс и площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время $AUC_{0-t(\text{плазма})}$ после его внутривенного введения: данные показатели статистически значимо не отличались от значений контрольных животных (рисунки 15, 16).

Применение рифампицина в течение 14 суток приводило к снижению концентрации фексофенадина в коре головного мозга крыс через 15 мин после его внутривенного введения на 49,5% ($p < 0,05$) и через 30 мин на 79,6% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями контрольных животных (таблица 9).

После введения индуктора Pgp также происходило достоверное снижение $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ фексофенадина на 39,6% ($p < 0,05$) и отношения $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ на 66,3% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рисунки 17, 18), что подтверждает адекватность используемой методики исследования.

Введение верапамила – классического ингибитора Pgp – не оказало существенного влияния на концентрацию фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга (таблица 9, рисунки 17, 18). Предположительно это связано с тем, что при введении верапамила происходило снижение систолического АД со $149,5 \pm 7,4$ до $94,8 \pm 8,7$ мм рт. ст. с последующим восстановлением АД до $138,8 \pm 8,8$ мм рт. ст. перед введением фексофенадина (артериальное давление измеряли непрямым методом на хвосте — tail-cuff method).

Однократное внутривенное введение ЭМГПС вызывало повышение концентрации фексофенадина в коре больших полушарий через 45 мин после введения последнего на 109,4% ($p = 0,07$) (таблица 9), а также увеличивало $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ фексофенадина на 125,0% ($p < 0,05$) и отношения $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ на 24,2% ($p = 0,06$) (рисунки 17, 18) по сравнению с показателями контрольных крыс.

Таблица 9 — Концентрация (нг/г) фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы (медиана, верхний и нижний квартили)

Группы эксперимента	Временные точки					
	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
Контроль	264,00 (198,98; 471,35)	288,27 (202,98; 754,8)	344,77 (245,99; 432,36)	301,68 (120,85; 638,02)	242,91 (201,78; 385,01)	172,16 (147,5; 192,28)
Рифампицин доза 20 мг/кг, per os 1 р/д 14 д	333,17 (256,99; 387,42)	262,19 (151,02; 694,45)	174,04 (82,49; 220,53)*	61,63 (46,71; 170,43)*	91,84 (65,66; 387,68)	97,27 (64,83; 153,55)
Верапамил доза 1,65 мг/кг, в/в, однократно	441,67 (260,84; 549,71)	270 (224,22; 423,6)	377,62 (253,6; 1540,65)	294,52 (227,09; 318,33)	89,66 (79,11; 274,1)	195,28 (55,68; 238,61)
ЭМГПС доза 50 мг/кг в/в, однократно	799,3 (299,5; 1627,3)	849,4 (617,9; 928,9)	908,9 (264,5; 1236,4)	356,6 (201,9; 647,1)	508,7 (320,4; 1839,7)* p=0,07	280,9 (146,9; 524,9)

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

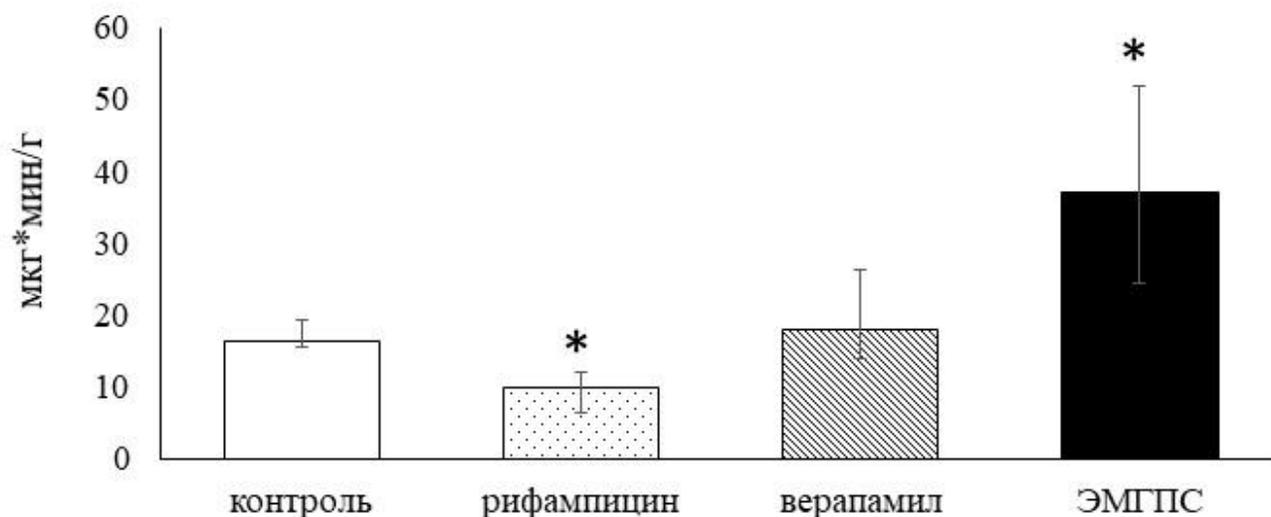


Рисунок 17 — Изменение $AUC_{0-t-мозг}$ фексофенадина при использовании рифампицина, верапамила и ЭМГПС перед внутривенным введением фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы (медиана, верхний и нижний квартили)

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

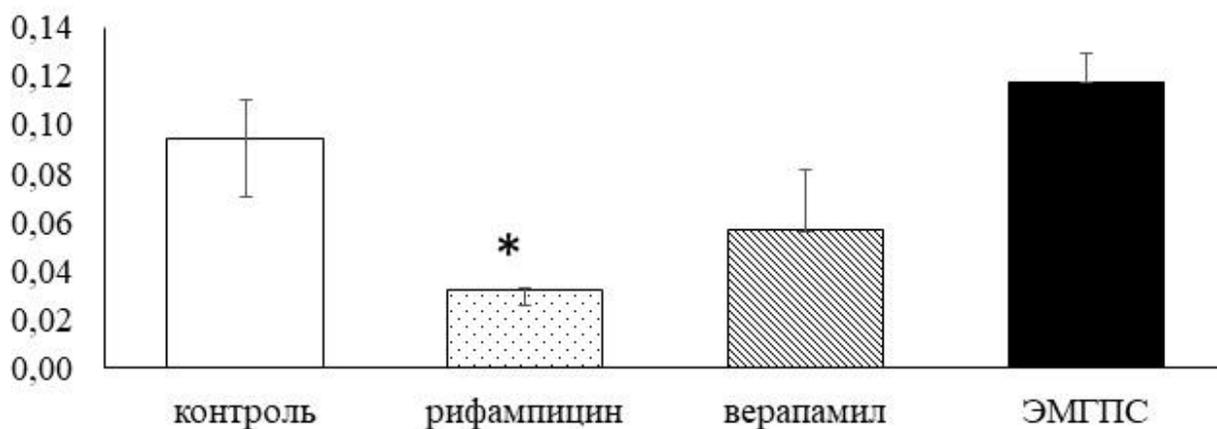


Рисунок 18 — Изменение $AUC_{0-t(мозг)} / AUC_{0-t(плазма)}$ фексофенадина при использовании рифампицина, верапамила и ЭМГПС перед внутривенным введением фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы (медиана, верхний и нижний квартили)

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

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что однократное внутривенное введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы снижает активность белка-транспортера Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс.

3.4. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на относительное количество гликопротеина-P в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс

Относительное количество Pgp в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс определяли иммуногистохимически.

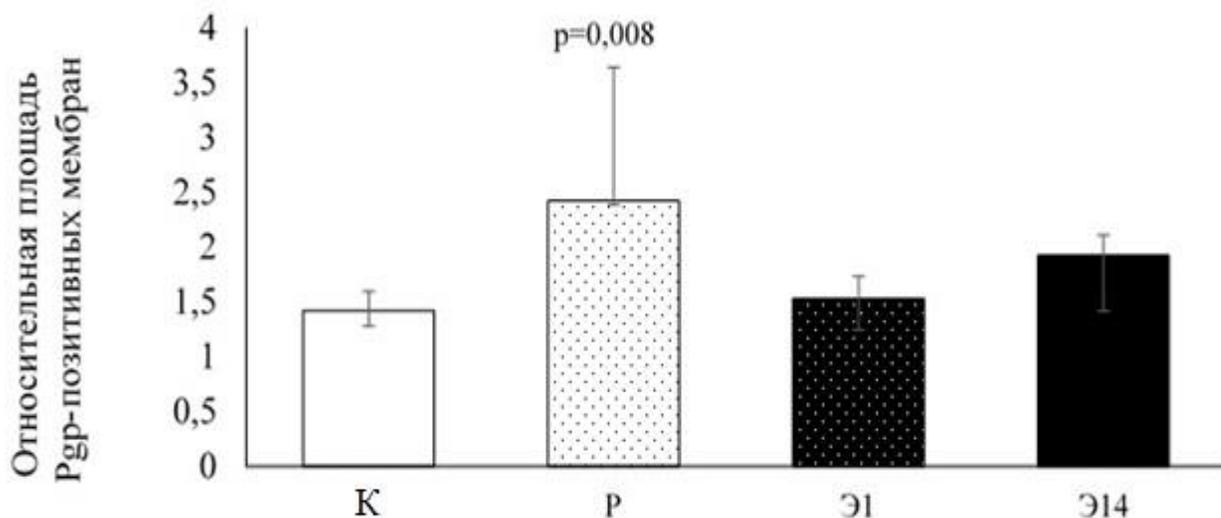


Рисунок 19 — Изменение относительного количества Pgp при использовании курсового введения рифампицина, однократного и курсового введений ЭМГПС в ГЭБ лобной коры больших полушарий головного мозга крыс (медиана, верхний и нижний квартили)

Примечание: К – контроль

Р – рифампицин в дозе 20 мг/кг, 1 р/д, 14 дней

Э1 – однократное в/в введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг

Э14 – внутрижелудочное введение ЭМГПС в дозе 100 мг/кг, 3 р/д, 14 суток

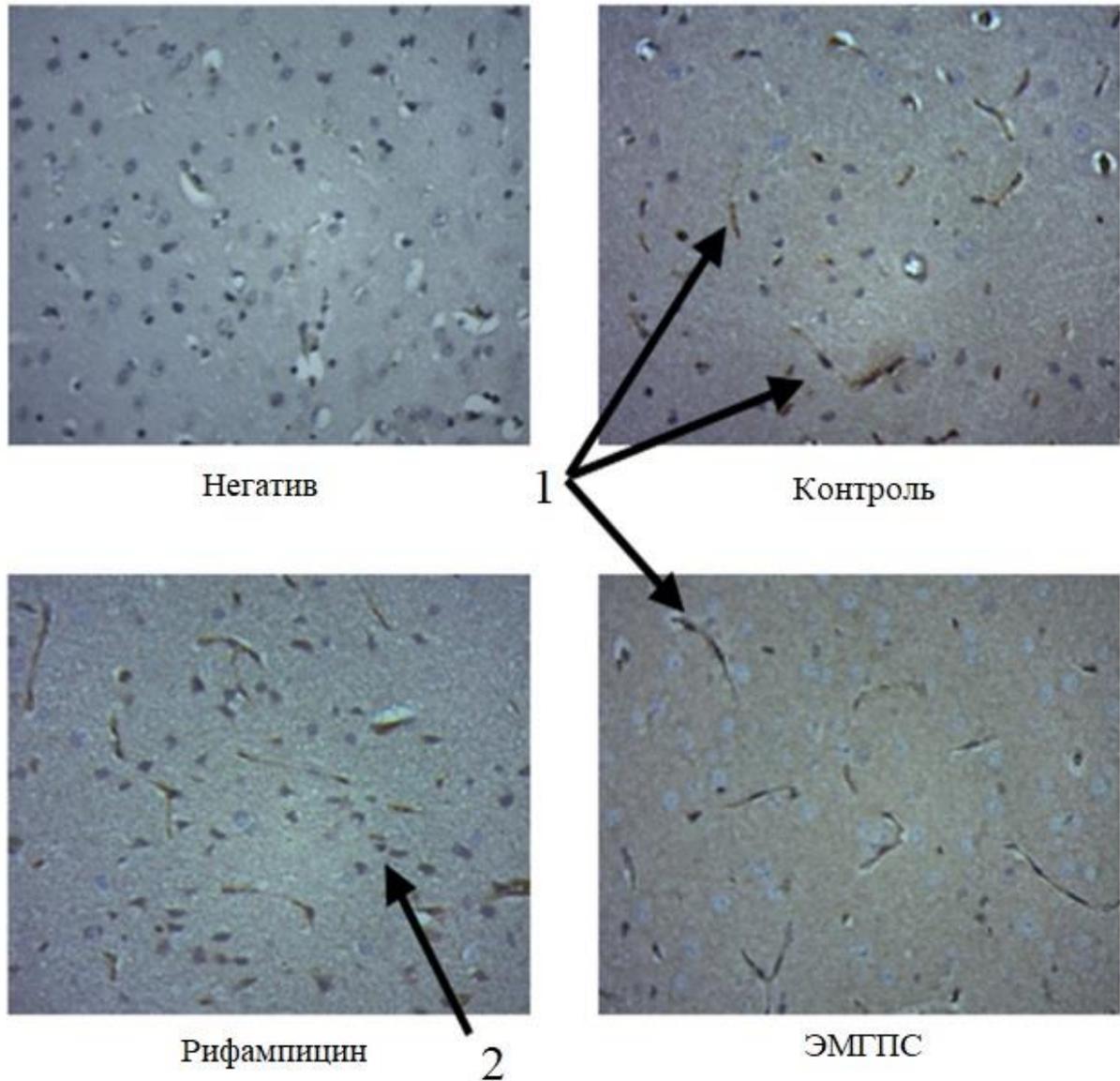


Рисунок 20 — Иммуногистохимическая реакция на Pgr в лобной доле коры головного мозга крыс в контроле и на фоне курсового внутрижелудочного введения рифампицина в дозе 20 мг/кг 2 раза в день в течение 14 дней и ЭМГПС в дозе 100 мг/кг 3 раза в день в течение 14 дней. Увеличение x40

Примечание:

Негатив – снимок образца без первичных антител к Pgr

1 – Pgr-позитивные фрагменты ГЭБ

2 – Pgr-позитивные ядра клеток

Иммунопозитивную реакцию с антителами к Pgr в ткани мозга помимо мембран

эндотелиальных клеток ГЭБ давали также единичные ядра клеток, однако их в анализ не включали (рисунок 20).

Курсовое введение классического индуктора Pgp – рифампицина – в течение 14 суток приводило к повышению относительного количества Pgp в ГЭБ, о чем свидетельствует достоверное повышение относительной площади Pgp позитивных мембран на 70,5% ($p=0,008$) по сравнению с показателями контрольных животных. При этом ни однократное внутривенное в дозе 50 мг/кг массы тела, ни курсовое внутрижелудочное в течение 14 суток в дозе 100 мг/кг массы тела введение ЭМГПС не оказывало достоверного эффекта на относительное количество Pgp в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс (рисунок 19).

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

3.5. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на активность и относительное количество гликопротеина-P в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс в условиях гипоксии

ЭМГПС – препарат, обладающий выраженной антиоксидантной и антигипоксантажной активностью и широко применяющийся при заболеваниях, в патогенезе которых важную роль играют гипоксия и оксидативный стресс. Поэтому в следующем эксперименте было изучено функционирование (активность и относительное количество) Pgp в ГЭБ коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс при гипоксии.

Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии приводило к следующим изменениям фармакокинетики маркерного субстрата Pgp – фексофенадина (рисунок 21).

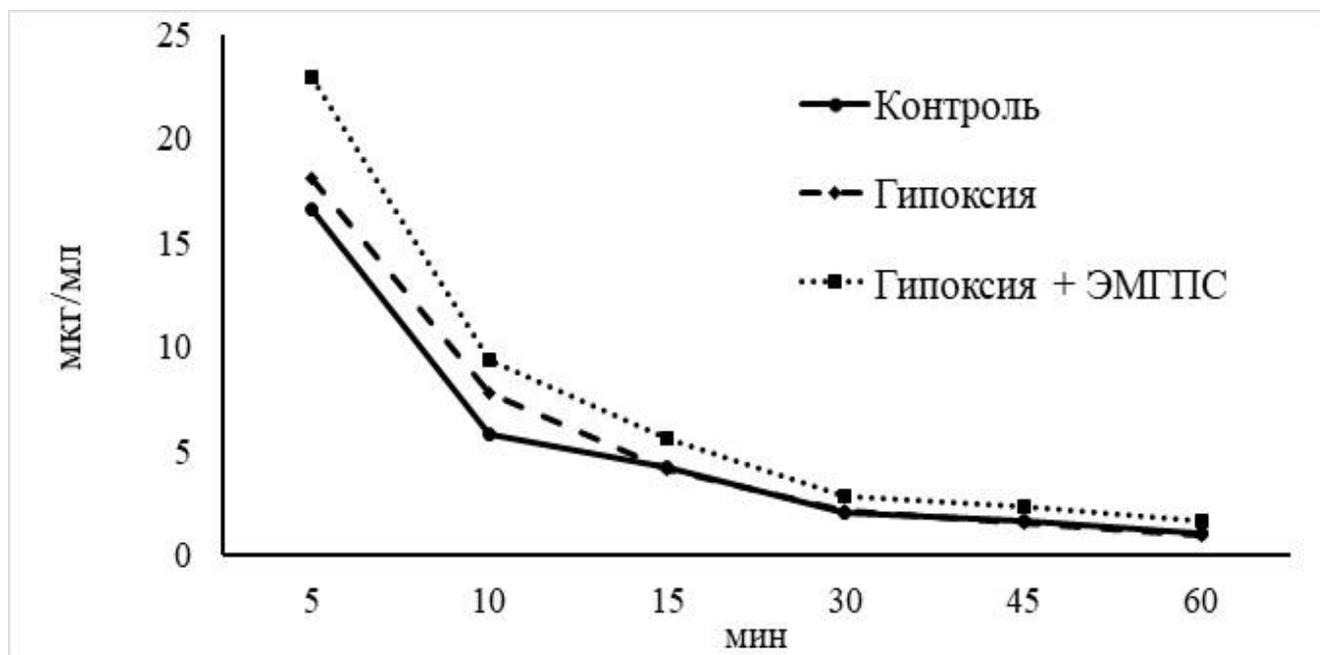


Рисунок 21 — Динамика концентрации фексофенадина в плазме крови крыс после его в/в введения в дозе 10 мг/кг у интактных крыс (контроль), крыс, подвергшихся гипоксии, и крыс, получивших в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг перед моделированием гипоксии (n=5 на каждую временную точку)

Концентрация фексофенадина в плазме крови крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы на фоне гипоксического воздействия достоверно не отличалась от показателей контрольных животных во всех исследуемых временных точках ($p > 0,05$). Также $AUC_{0-t(\text{плазма})}$ фексофенадина достоверно не отличалась между группами гипоксии и контроля (интактные крысы) (рисунок 22).

В то же время концентрация фексофенадина в гомогенате коры мозга после гипоксического воздействия превосходила показатели контрольных животных через 5, 15, 45 и 60 мин после его внутривенного введения на 246,5% ($p=0,008$), 100,4% ($p=0,063$), 187,7% ($p=0,01$) и 120,9% ($p=0,04$) соответственно. $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ и отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ фексофенадина после гипоксического воздействия также превышали значения группы контроля на 105,1% ($p=0,003$) и 47,1% ($p=0,027$) соответственно (рисунок 23, 24). Полученные результаты характеризуют повышение

проникновения фексофенадина в кору головного мозга крыс после моделирования острой гипоксической гипобарической гипоксии.

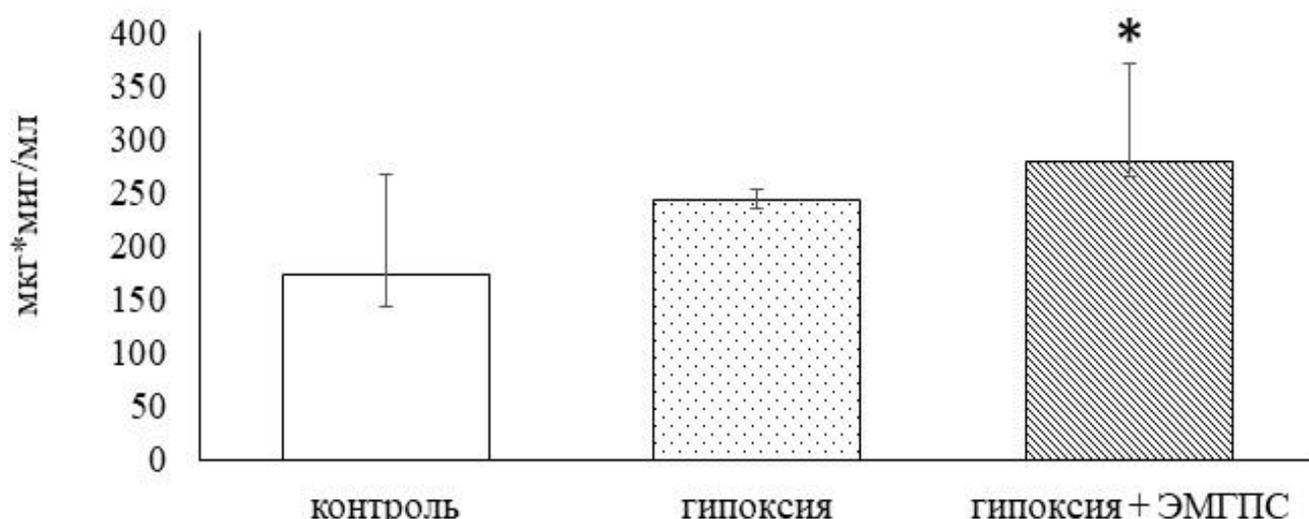


Рисунок 22 — Изменение $AUC_{0-t-плазма}$ фексофенадина после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг интактным крысам (контроль), крысам на фоне гипоксии и крысам, получившим в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг перед моделированием гипоксии (медиана, верхний и нижний квартили)

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

Превентивное однократное внутривенное введение ЭМГПС перед гипоксическим воздействием приводило к следующим изменениям. Концентрация фексофенадина в плазме крови после его внутривенного введения на фоне тестируемого вещества и последующего моделирования гипоксии превосходила значение контрольных животных только на 60 мин на 59,0% ($p=0,018$), а в остальные сроки эксперимента достоверных различий между группами выявлено не было. При этом $AUC_{0-t(плазма)}$ фексофенадина после введения ЭМГПС перед гипоксическим воздействием превышала аналогичный показатель контрольных животных на 60,8% ($p=0,011$).

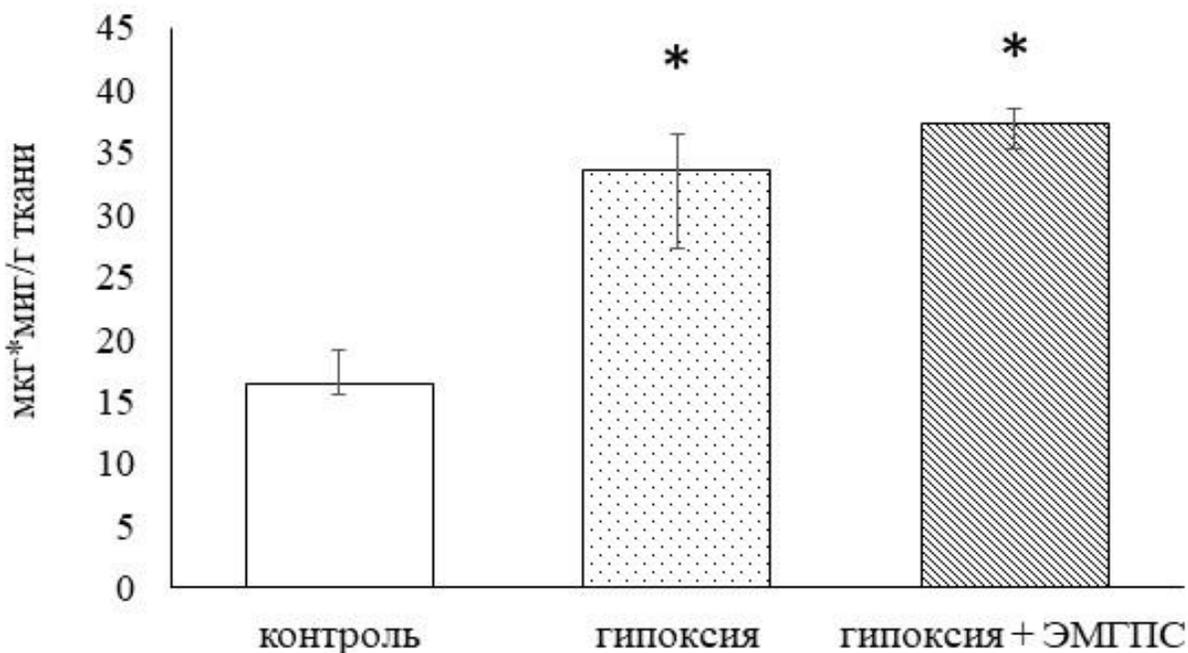


Рисунок 23 — Изменение $AUC_{0-t-мозг}$ фексофенадина после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг интактным крысам (контроль), крысам на фоне гипоксии и крысам, получившим в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг перед моделированием гипоксии (медиана, верхний и нижний квартили).

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

Концентрация фексофенадина в гомогенате коры мозга после гипоксического воздействия и введения ЭМГПС превосходила показатели контрольных животных через 5 мин – на 201,4% ($p=0,008$), через 15 мин – на 83,9% ($p=0,016$), через 30 мин – на 158,8% ($p=0,01$), через 45 мин – на 158,1% ($p=0,01$), через 60 мин – на 140,2% ($p=0,004$; рисунок 22). $AUC_{0-t(мозг)}$ фексофенадина после комбинированного воздействия также превосходила значения серии контроля на 127,6% ($p=0,003$), а отношение $AUC_{0-t(мозг)} / AUC_{0-t(плазма)}$ – на 41,5% ($p=0,032$; рисунок 23). Полученные результаты свидетельствуют о повышении проникновения фексофенадина в кору

головного мозга крыс после моделирования острой гипоксической гипобарической гипоксии и введения ЭМГПС.

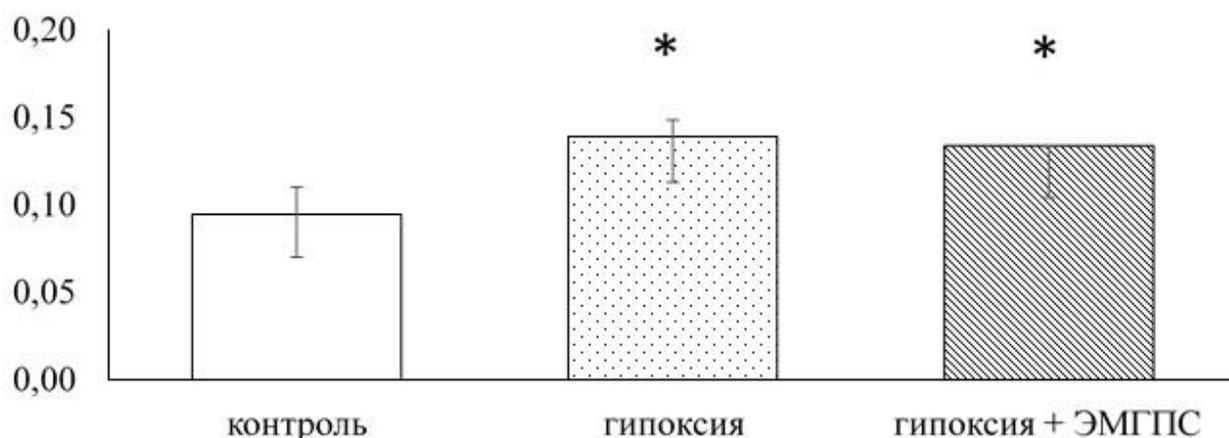


Рисунок 24 — Изменение $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$ фексофенадина после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг интактным крысам (контроль), крысам на фоне гипоксии и крысам, получившим в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг перед моделированием гипоксии (медиана, верхний и нижний квартили).

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

При сравнении фармакокинетики фексофенадина у крыс, подвергнутых острой гипоксической гипобарической гипоксии, и крыс, получавших ЭМГПС перед гипоксическим воздействием были получены следующие результаты.

Концентрация фексофенадина в плазме крови экспериментальных животных во все временные точки достоверно между данными группами не отличалась — только на 60 мин концентрация маркерного субстрата Pgp на фоне введения ЭМГПС превышала показатели крыс, подвергнутых изолированной гипоксии, на 78,7% ($p=0,016$). Не было выявлено достоверных различий и в значениях $AUC_{0-t(\text{плазма})}$.

Таблица 10 — Концентрация фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг интактным крысам (контроль), крысам на фоне гипоксии и крысам, получившим в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг перед моделированием гипоксии (медиана, нижний и верхний квартили).

Группы эксперимента	Временные точки					
	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
Контроль	264,00 (198,98; 471,35)	288,27 (202,98; 754,8)	344,77 (245,99; 432,36)	301,68 (120,85; 638,02)	242,91 (201,78; 385,01)	172,16 (147,5; 192,28)
Гипоксия	914,68 (834,97; 997,26)*	710,80 (614,81; 761,43)	690,76 (484,61; 799,71)*	437,9 (261,1; 648,6)	698,89 (578,04; 778,46)*	380,3 (341,76; 434,64)*
Гипоксия + ЭМГПС	795,64 (723,61; 844,91)*	750,43 (628,07; 802,72)	633,95 (603,66; 699,49)*	780,72 (697,99; 825,93)*	626,87 (492,29; 695,28)*	413,49 (322,32; 436,69)*

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

Концентрации фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс после введения ЭМГПС и моделирования гипоксии достоверно не различались ($p > 0,05$). Также не было выявлено статистически значимых различий в значениях $AUC_{0-t(\text{мозг})}$ и $AUC_{0-t(\text{плазма})}$ данных экспериментальных групп.

При изучении влияния острой гипоксической гипоксии и превентивного однократного внутривенного введения ЭМГПС перед гипоксическим воздействием на относительное количество Pgr в ГЭБ лобной коры головного мозга крыс были получены следующие результаты (рисунок 25).

Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии приводило к повышению относительной площади Pgr-позитивных мембран на 50,9% ($p = 0,008$) по сравнению с контролем (рисунок 25).

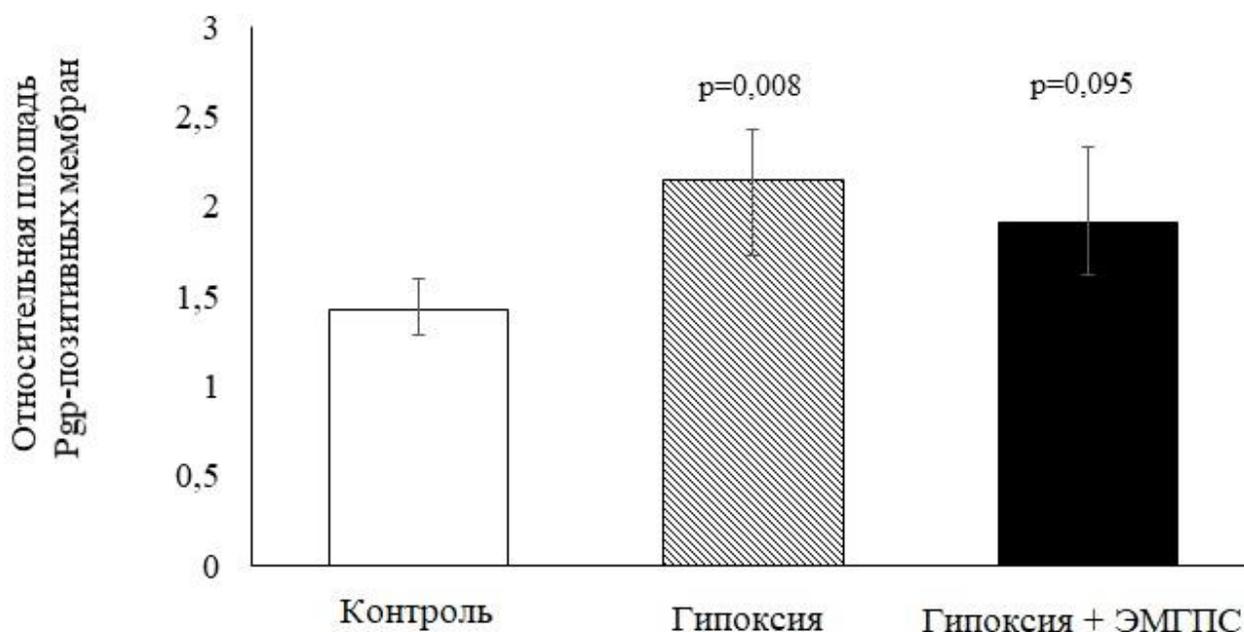


Рисунок 25 — Относительная площадь Pgr-позитивных мембран в ГЭБ лобной коры больших полушарий головного мозга интактных крыс (контроль), крыс на фоне гипоксии и крыс, получивших в/в ЭМГПС в дозе 50 мг/кг перед моделированием гипоксии (медиана, верхний и нижний квартили)

Введение ЭМГПС перед моделированием гипоксии нивелировало индуцирующее действие дефицита кислорода на уровень Pgp: достоверных различий с контрольными значениями получено не было — отмечалась лишь тенденция к повышению относительной площади Pgp-позитивных мембран (на 34,7%, $p=0,095$).

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

3.6. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 и оксидативный статус в лобной коре больших полушарий головного мозга крыс в норме и при гипоксии

Для изучения механизмов изменения функционирования Pgp при острой гипоксической гипобарической гипоксии и введении ЭМГПС было оценено относительное количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 и выраженность окислительного стресса в лобной коре больших полушарий головного мозга крыс.

В коре лобной доли головного мозга крыс HIF-1 α -позитивно окрашивались ядра клеток, а Nrf2-позитивно — не только ядра клеток, но и гематоэнцефалический барьер. Нервная ткань представлена не только нейронами, но и глиальными клетками. В нашем исследовании мы не проводили дифференцировку клеток на нейроны и клетки глии, а подсчитывали общее число иммунопозитивных ядер клеток и их

относительную площадь (рассчитывалась как площадь ядер, разделенная на площадь поля зрения и умноженная на 100%) (рисунок 26).

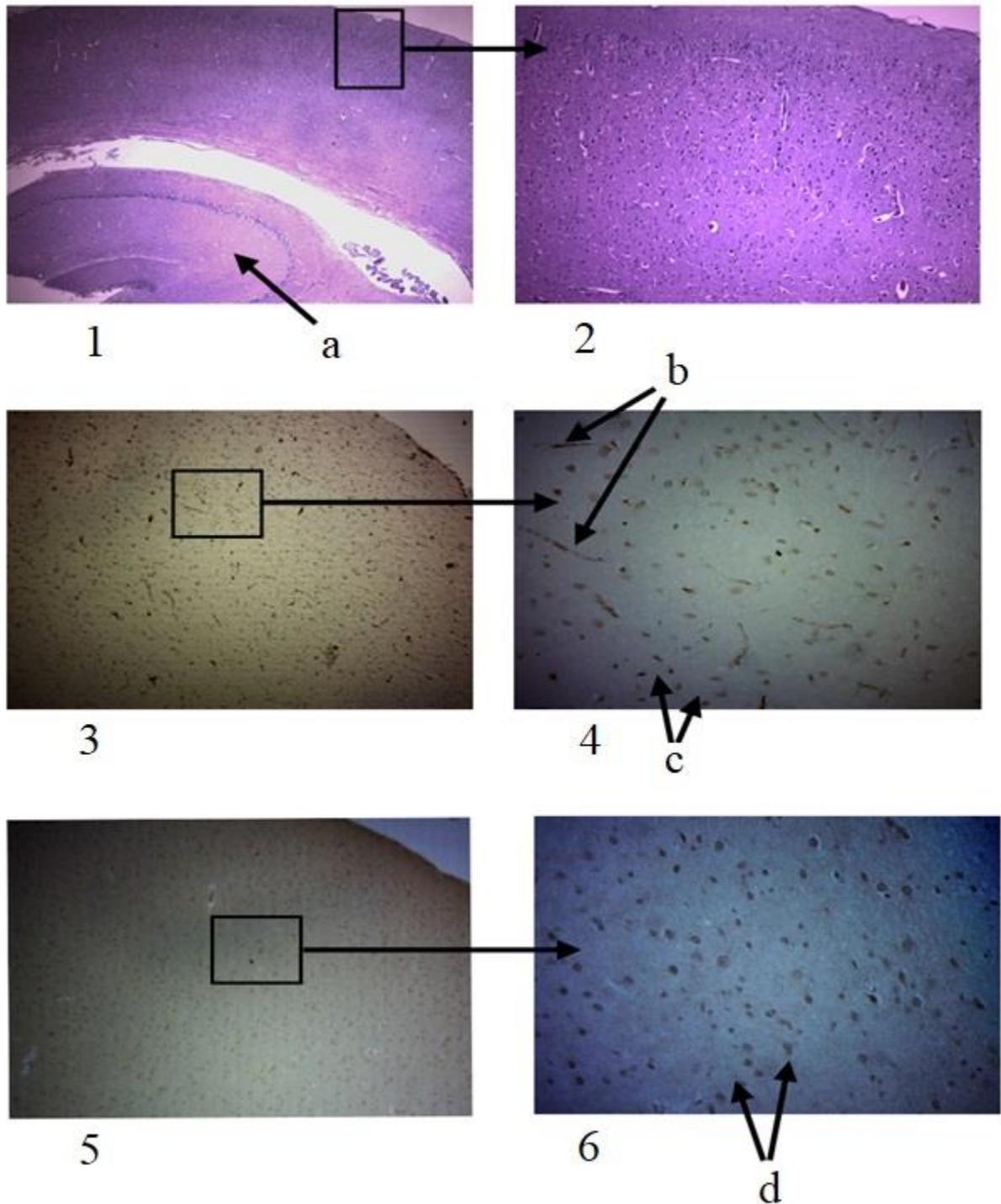


Рисунок 26 — Иммуногистохимическая реакция образцов интактного мозга

Примечание к рисунку 26:

1 – кора лобной доли больших полушарий головного мозга, увеличение $\times 40$, окраска гематоксилином и эозином

2 – кора лобной доли больших полушарий головного мозга, увеличение $\times 100$, окраска гематоксилином и эозином

3 – иммуногистохимическое окрашивание Nrf2-позитивных структур в коре лобной доли больших полушарий головного мозга, увеличение $\times 100$

4 – иммуногистохимическое окрашивание Nrf2-позитивных структур в коре лобной доли больших полушарий головного мозга, увеличение $\times 400$

5 – иммуногистохимическое окрашивание HIF-1 α -позитивных структур в коре лобной доли больших полушарий головного мозга, увеличение $\times 100$

6 – иммуногистохимическое окрашивание HIF-1 α -позитивных структур в коре лобной доли больших полушарий, увеличение $\times 400$

Обозначения:

«а» – гиппокамп

«b» – Nrf2-позитивный гематоэнцефалический барьер

«с» – Nrf2-позитивные ядра

«d» – HIF-1 α -позитивные ядра

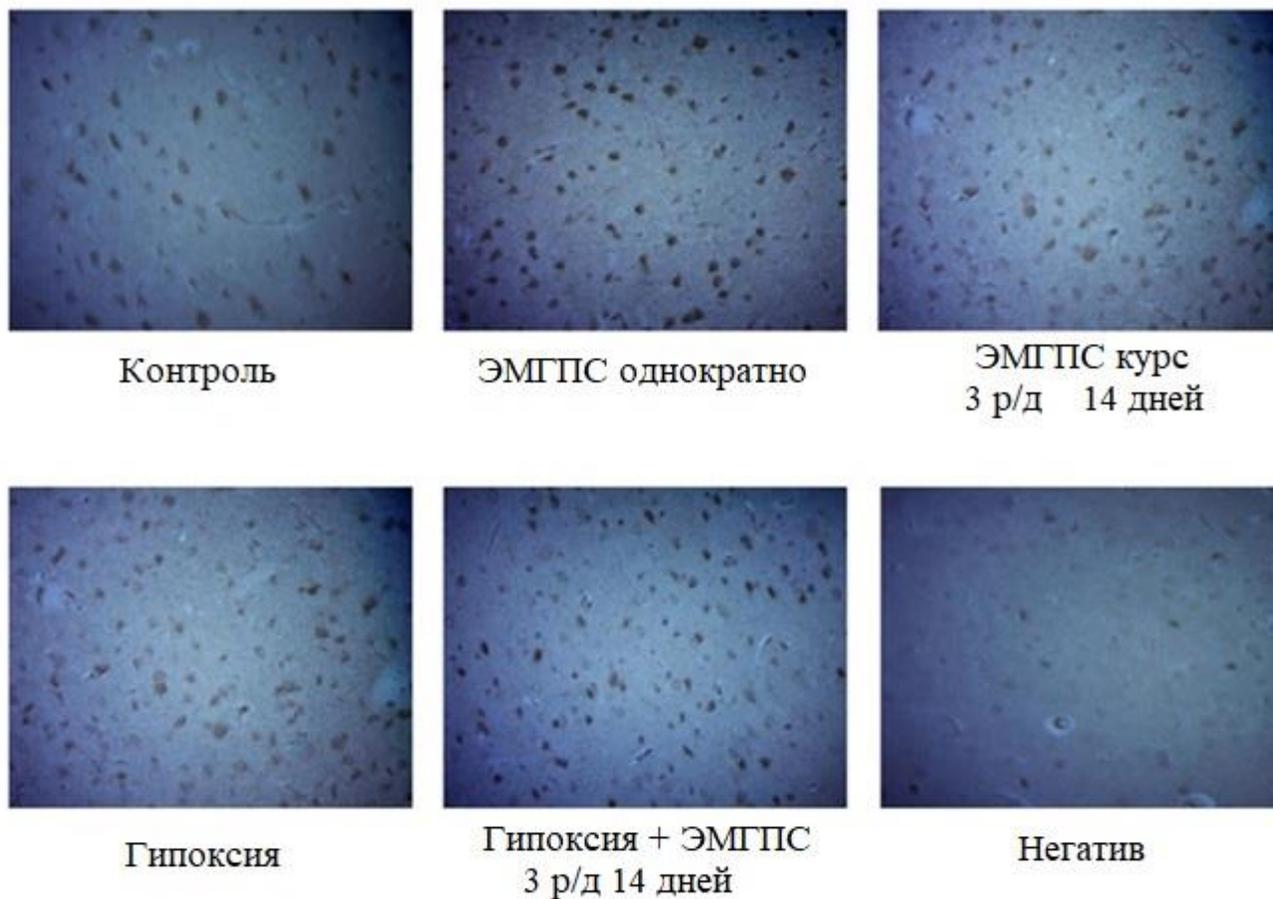


Рисунок 27 — HIF-1 α -позитивные ядра клеток в коре лобной доли больших полушарий головного мозга крыс разных серий, увеличение $\times 400$

Примечание: негатив – окраска без первичных антител к HIF-1 α

Площадь Nrf2-позитивноокрашенного гематоэнцефалического барьера не анализировалась. HIF-1 α и Nrf2-позитивные ядра клеток анализировали в 4 слое лобной доли коры больших полушарий головного мозга.

Результаты иммуногистохимического анализа представлены на рисунках 26-28, а также в таблицах 11 и 13.

Ни однократное внутрив брюшинное введение ЭМГПС, ни курсовое пероральное использование тестируемого препарата в течение 14 дней не влияли на количество и

относительную площадь Nrf2-позитивных ядер в лобной коре больших полушарий головного мозга крыс (рисунок 27).

Аналогичные результаты получены и при изучении влияния ЭМГПС на количество и относительную площадь Nrf2-позитивных ядер в коре лобной доли больших полушарий головного мозга – препарат не изменял данные показатели (рисунок 28, таблица 11).

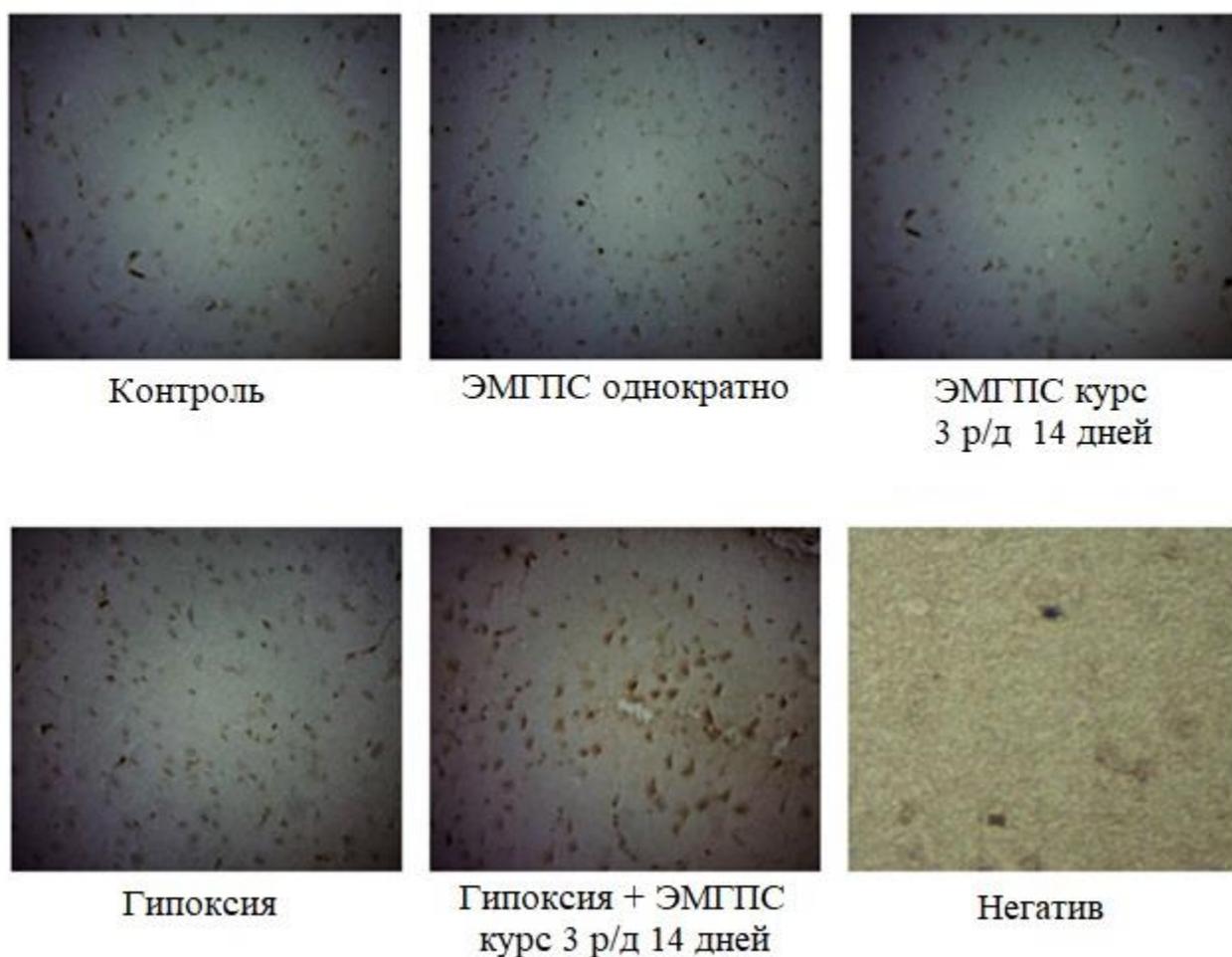


Рисунок 28 — Nrf2 – позитивные ядра клеток в коре лобной доли больших полушарий головного мозга крыс разных серий, увеличение x400

Примечание: негатив – окраска без первичных антител к Nrf2

Таблица 11 — Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) на относительное количество HIF-1 α и Nrf2 в ткани коры лобной доли больших полушарий головного мозга интактных крыс (медиана, нижний и верхний квартили)

Показатель	Контроль (n=5)	ЭМГПС, внутрибрюшинно 120 мг/кг однократно (n=5)	ЭМГПС, внутрижелудочно 100 мг/кг 3 р/д курс 14 дней (n=5)
Количество HIF-1 α - позитивных ядер клеток	104,0 (94,0; 143,0)	92,0 (86,0; 100,0)	101,0 (88,0; 113,0)
Относительная площадь HIF-1 α - позитивных ядер клеток, %	0,96 (0,87; 1,12)	0,97 (0,86; 1,03)	0,92 (0,88; 1,10)
Количество Nrf2- позитивных ядер клеток	143,0 (93,0; 154,0)	121,0 (116,0; 132,0)	112,0 (105,0; 155,0)
Относительная площадь Nrf2 - позитивных ядер клеток, %	1,45 (1,19; 1,95)	1,33 (1,16; 1,95)	1,59 (1,38; 3,02)

Таблица 12 — Влияние ЭМГПС на оксидативный статус в ткани коры лобной доли больших полушарий головного мозга интактных крыс (медиана, нижний и верхний квартили)

Показатель	Контроль (n=5)	ЭМГПС, внутрибрюшинно 120 мг/кг однократно (n=5)	ЭМГПС, внутрижелудочно 100 мг/кг 3 р/д курс 14 дней (n=5)
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	9,11 (7,77; 10,72)	9,94 (8,77; 13,19)	9,44 (8,09; 10,14)
Небелковые SH-группы, мкмоль/мг белка	4,88 (4,26; 5,34)	5,45 (4,83; 6,46)	6,72 (4,55; 8,02)
G-per, нмоль НАДФН/мин×мг белка	20,48 (18,6; 22,76)	16,24 (15,09; 21,28)	19,45 (17,12; 22,36)
G-tr, нмоль ХДНБ/мин×мг белка	82,32 (70,55; 91,17)	75,80 (66,67; 77,95)	73,22 (62,75; 92,73)

Таблица 13 — Влияние ЭМГПС на относительное количество HIF-1 α и Nrf2 в ткани коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс при острой гипоксической гипобарической гипоксии (медиана, нижний и верхний квартили)

Показатель	Контроль (n=5)	Гипоксия (n=5)	Гипоксия+ЭМГПС (внутрижелудочно 100 мг/кг 3 р/д 14 дней) (n=5)
Количество HIF-1 α - позитивных ядер клеток	104,0 (94,0; 143,0)	130,0 (120,0; 143,0)	134,0 (117,0; 208,0)
Относительная площадь HIF- 1 α -позитивных ядер клеток, %	0,96 (0,87; 1,12)	1,31 (1,27; 1,55)*	1,05 (0,917; 1,41)
Количество Nrf2-позитивных ядер клеток	143,0 (93,0; 154,0)	110,0 (108,0; 141,0)	171,0 (152,0; 184,0)*,#
Относительная площадь Nrf2 -позитивных ядер клеток, %	1,45 (1,19; 1,95)	2,06 (1,77; 2,89)*	2,73 (2,69; 2,88)*

* - $p < 0,05$ – достоверные различия с показателями контроля

- $p < 0,05$ – достоверные различия с показателями крыс группы гипоксии

Таблица 14 — Влияние ЭМГПС на оксидативный статус в ткани коры лобной доли больших полушарий головного мозга крыс при острой гипоксической гипобарической гипоксии (медиана, нижний и верхний квартили)

Показатель	Контроль (n=5)	Гипоксия (n=5)	Гипоксия+ЭМГПС (внутрижелудочно 100 мг/кг 3 р/д 14 дней) (n=5)
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	9,11 (7,77; 10,72)	12,06 (10,89; 13,17)*	11,36 (10,08; 12,04)
Небелковые SH-группы, мкмоль/мг белка	4,88 (4,26; 5,34)	5,31 (4,4; 8,34)	7,46 (5,8; 9,57)*
G-per, нмоль НАДФН/мин×мг белка	20,48 (18,6; 22,76)	14,14 (13,2; 15,63)*	16,79 (14,90; 18,51)
G-tr, нмоль ХДНБ/мин×мг белка	82,32 (70,55; 91,17)	67,47 (64,21; 71,99)	66,55 (51,70; 71,93)

* - $p < 0,05$ – достоверные различия с показателями контроля

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение ЭМГПС интактным животным не влияет на уровень транскрипционных факторов Nf1 α и Nrf2 в лобной коре больших полушарий головного мозга.

Курсовое и однократное введение ЭМГПС также не оказало существенного влияния на концентрацию ТБК-реактивных продуктов, уровень небелковых SH-групп, активность глутатион-S-трансферазы (G-tr) и глутатионпероксидазы (G-per) в гомогенате коры головного мозга крыс (таблица 12).

Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии приводило к увеличению относительной площади HIF-1 α -позитивных ядер клеток в лобной коре головного мозга крыс на 32,3% ($p=0,032$) и площади Nrf2-позитивных ядер клеток на 42,1% ($p=0,056$). При этом ни количество HIF-1 α -позитивных ядер клеток, ни количество Nrf2-позитивных ядер клеток статистически значимо от значений интактных животных не отличались (таблица 13).

Данные изменения свидетельствуют о том, что при острой гипоксической гипобарической гипоксии в ткани коры головного мозга увеличивается количество транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2.

Превентивное внутрижелудочное введение этилметилгидроксипиридина сукцината в дозе 100 мг/кг 3 раза в день в течение 14 дней до гипоксического воздействия приводило к следующим результатам. Количество HIF-1 α –позитивных клеток в коре лобной доли головного мозга крыс, а также их относительная площадь статистически значимо не отличались ни от показателей интактных животных группы контроля, ни от показателей крыс группы гипоксии.

В то же время количество Nrf2-позитивных ядер у животных, которым осуществляли курсовое введение ЭМГПС, превышало показатели интактных крыс на 19,6% ($p=0,032$), а также значения у животных группы гипоксии на 55,5% ($p=0,016$). Относительная площадь Nrf2-позитивных ядер превышала показатели нормы на 88,3% ($p=0,008$) и достоверно от значений контроля гипоксии не отличалась (таблица 13).

При изучении свободнорадикального статуса гомогената коры лобной доли больших полушарий крыс были получены следующие результаты.

Гипоксическое воздействие приводило к повышению уровня ТБК-реактивных продуктов в гомогенате коры лобной доли головного мозга крыс на 32,3% ($p=0,052$) по сравнению с показателями интактных животных. Превентивное введение ЭМГПС препятствовало повышению ТБК-реактивных продуктов: их концентрация после гипоксического воздействия достоверно не отличалась ни от показателей интактных животных, ни от показателей группы контроля гипоксии.

При гипоксическом воздействии у контрольных животных концентрация небелковых SH-групп статистически значимо от показателей интактных животных не отличалась, а на фоне введения ЭМГПС наблюдалось их повышение на 52,9% ($p=0,017$).

Активность G-per при острой гипоксической гипобарической гипоксии снижалась в группе контроля гипоксии на 30,9% ($p=0,004$), а в группе крыс, получавших ЭМГПС, достоверно не отличалась от показателей интактных животных (таблица 14).

Воздействие изолированной гипоксии и гипоксии на фоне введения ЭМГПС не приводило к статистически значимому изменению активности G-tr по сравнению с показателями интактных животных. Статистически значимых различий между показателями контрольных и опытных животных также получено не было.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что курсовой приём ЭМГПС улучшает оксидативный статус клетки при острой гипоксической гипобарической гипоксии, препятствует повышению уровня NIF-1 α и способствует увеличению относительного количества Nrf2.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Якушева Е. Н., Мыльников П. Ю., Черных И. В., Щулькин А.В. Влияние мексидола на экспрессию транскрипционного фактора Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга при экспериментальной ишемии // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2018. – Т. 118. – №. 5. – С. 64-68.

Якушева Е. Н., Мыльников П. Ю., Черных И. В., Шулькин А.В. Влияние мексидола на экспрессию фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1 α , в коре больших полушарий головного мозга крыс при ишемии // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2017. – Т. 117. – №. 10. – С. 87-91.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) – лекарственное вещество, обладающее выраженной антиоксидантной и антигипоксантаминой активностью. Эффективность лекарственных препаратов, содержащих ЭМГПС, была доказана в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях. Они используются при широком спектре заболеваний в неврологической, кардиологической, хирургической практике, а также при некоторых инфекционных заболеваниях [111].

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – комплексная структура, которая ограждает головной мозг от воздействия потенциально опасных эндо- и ксенобиотиков [128]. Данный барьер отличается очень плотными межклеточными контактами и крайне низкой проницаемостью через него различных веществ благодаря наличию эффлюксных белков-транспортёров, одним из которых является гликопротеин-P (Pgp) [135].

Субстратами Pgp преимущественно являются липофильные вещества с молекулярной массой 330-4000 Да, среди которых имеется достаточно большое количество лекарственных веществ [112]. Высокая активность Pgp часто служит причиной резистентности заболевания к фармакотерапии, например, при эпилепсии [74; 123; 203; 231]. Также многочисленными исследованиями показано изменение функциональной активности данного белка-транспортёра в ГЭБ при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона [123], болезнь Альцгеймера [123], депрессия [103; 189], шизофрения [145; 196], амиотрофический латеральный и рассеянный склерозы [123; 223], ВИЧ-индуцированные энцефалопатии [174; 202], печёночная энцефалопатия [113]. Важно отметить и возможное изменение его активности в процессе нормальной жизнедеятельности человека: было описано влияние на активность Pgp половых гормонов [56], инсулина [153], изменение активности белка-транспортёра в зависимости от циркадных ритмов [94].

Важно отметить и тот факт, что при острых и хронических заболеваниях ЦНС кроме воздействия на функциональную активность Pgp в ГЭБ наблюдается изменение концентрации нейротрофинов (например, NGF и BDNF), которые в свою очередь могут влиять на относительное количество и функциональную активность других белков и ферментов [106]. Ряд нейропротекторных препаратов обладает способностью увеличивать уровень данных веществ, повышая таким образом выживаемость нейронов [30].

В рамках данного исследования в ходе экспериментов *in vitro* и *in vivo* было оценено влияние ЭМГПС на функциональную активность Pgp в норме и при гипоксической гипоксии, а также рассмотрено воздействие данного вещества на транскрипционные факторы HIF-1 α и Nrf2, которые могут отвечать за изменение количества белка-транспортера в условиях гипоксии, а также вносить определённый вклад в реализацию антигипоксического и антиоксидантного действия ЭМГПС.

В ходе исследования *in vitro* нами было оценено изменение активности Pgp при действии ЭМГПС. Оценку влияния проводили на клетках линии Caco-2 по интенсивности трансмембранного транспорта субстрата белка-транспортёра — фексофенадина. Были рассчитаны коэффициенты кажущейся проницаемости фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную и из апикальной камеры в базолатеральную с последующим расчётом их отношения, характеризующего асимметрию транспорта [108].

Полученные результаты показали, что при использовании ЭМГПС наблюдалось сравнимое с воздействием верапамила – классического ингибитора Pgp – снижение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости в опытах *in vitro*, что свидетельствует о выраженной прямой ингибирующей активности тестируемого вещества в отношении данного белка-транспортёра.

Ранее в исследовании сотрудников кафедры фармакологии РязГМУ было установлено, что ЭМГПС не является субстратом Pgp, что позволяет признать

гипотезу о субстратном ингибировании активности белка-транспортёра маловероятной [62]. В ходе дальнейшего литературного анализа наиболее вероятным механизмом взаимодействия было признано аллостерическое ингибирование активности Pgp. Данный механизм ранее был описан для лекарственных препаратов дигидропиридинового ряда – никардипина (рисунок 29), нимодипина, нитрендипина и нифедипина [117].

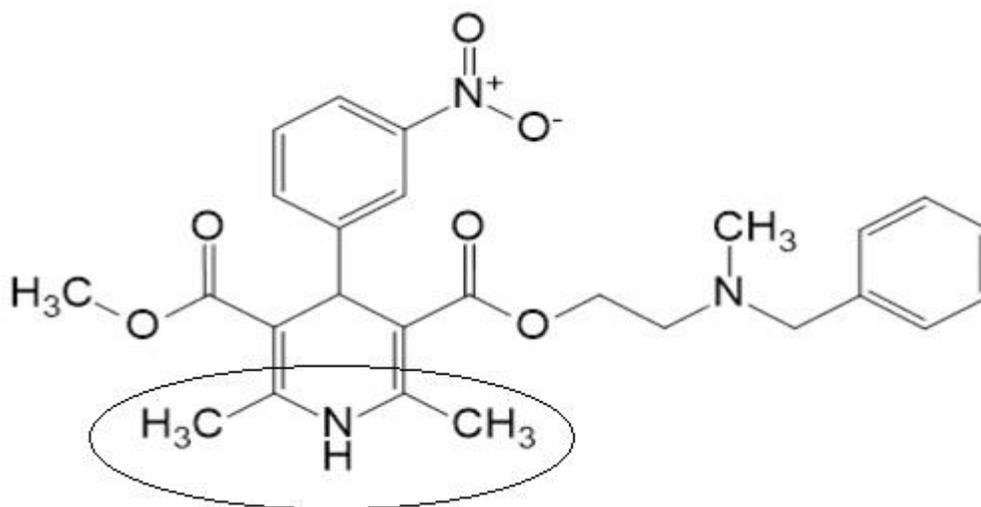


Рисунок 29 — Химическая формула никардипина (овалом обведён предполагаемый реакционный центр)

В настоящее время в структуре Pgp выделяют 3 сайта связывания субстратов (транспортируемых веществ) и 1 аллостерический сайт, называемый М-сайтом, который изменяет активность белка-транспортёра [79; 116]. М-сайт перекрёстно взаимодействует с обеими половинами белка-транспортёра, обладая способностью изменять их конформацию и таким образом регулируя эффлюкс субстратов Pgp. Более поздними исследованиями было установлено, что аллостерические ингибиторы (такие, как тариквидар) способны нарушать закрытие внутриклеточного трансмембранного домена и в целом формировать соответствующие изменения в структуре, приводящие к затруднению транспорта субстрата из клетки наружу [98].

С целью проверки вероятности данной гипотезы был проведён анализ литературных данных по физико-химическим свойствам производных 3-оксипиридинов, в результате чего было обнаружено, что указанные вещества в водных средах находятся преимущественно в состоянии цвиттер-иона [150; 162; 173; 239]. В случае ЭМГПС образование цвиттер-иона обусловлено переходом атома водорода с гидроксильной группы в мета-положении к атому азота в пиридиновом цикле, в результате чего образуется отрицательный заряд на атоме кислорода и положительный – на атоме азота (рисунок 29). Данное явление показывает наличие подвижного атома водорода в молекуле, что также может служить основанием для объяснения антиоксидантного действия данного вещества.

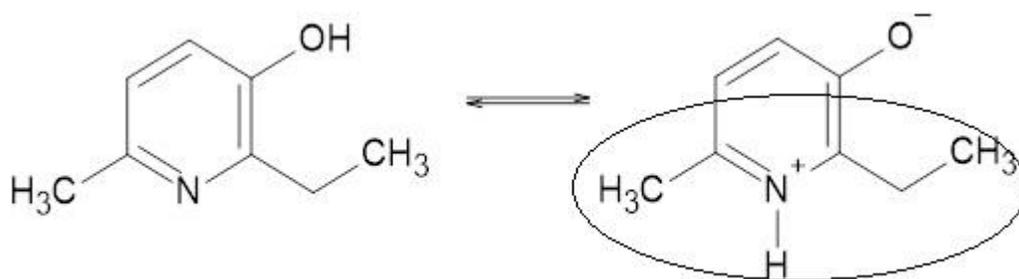


Рисунок 30 — Структура ЭМГП и цвиттер-ионной формы (овалом обведён предполагаемый реакционный центр)

Наличие атома водорода, связанного с атомом азота, находящегося в ароматическом цикле, двух алкильных остатков в орто-положении, а также кислород-содержащего радикала в мета-положении, может обосновать сходство реакционных участков ЭМГП и молекул дигидропиридиновых производных.

Поскольку химическая структура ЭМГП близка к структуре пиридоксина – витамина В6 – который в водных растворах также существует в виде цвиттер-иона [150], был проведён поиск научных данных о влиянии данного соединения и его активных форм на функциональную активность Pgr. Однако не было обнаружено

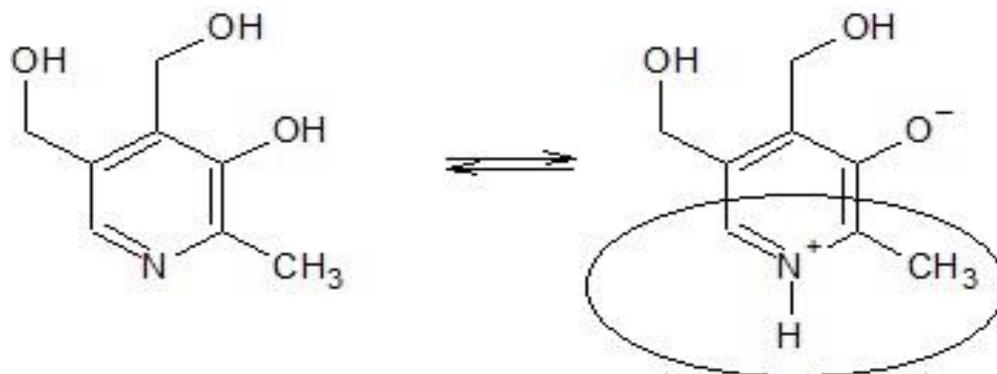


Рисунок 31 — Структура пиридоксина и цвиттер-ионной формы (овалом обведён предполагаемый реакционный центр)

полноценных и современных сведений по данному вопросу: имеются только упоминания о его слабом ингибирующем влиянии на активность изучаемого транспортёра [216]. Это может быть связано с отсутствием алкильного радикала во втором орто-положении, либо с наличием метоксильного радикала в пара-положении, либо с быстрым превращением в организме в фосфорилированные соединения или окисленные активные формы.

Для выполнения следующего этапа исследования нами была разработана методика оценки функциональной активности Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс, основанная на анализе проникновения маркерного субстрата белка-транспортёра – фексофенадина – в ткань мозга после его внутривенного введения. В ходе работы была осуществлена подготовка лекарственного препарата к инъекционному введению, подобраны оптимальные условия пробоподготовки биоматериала для последующего хроматографического анализа, а также были рассчитаны аналитические параметры методики и обозначен аналитический диапазон. Полученная методика успешно прошла процесс валидации [34; 115; 126]. Проверку адекватности методики оценки функциональной активности Pgp в ГЭБ проводили с использованием рифампицина, классического индуктора гликопротеина-P, и верапамила, классического ингибитора изучаемого белка-транспортёра. С помощью

данной методики было подтверждено повышение функциональной активности Pgp при введении рифампицина, что соответствует литературным данным о его влиянии на данный белок [186]. В то же время понижение функциональной активности при использовании верапамила зарегистрировано не было, что можно объяснить кратковременным снижением артериального давления при введении препарата, уменьшением интенсивности кровотока в мозге с последующим замедлением диффузии маркерного субстрата в ткань головного мозга, компенсирующим повышение проницаемости вследствие уменьшения активности Pgp.

С помощью разработанной методики было оценено изменение функционирования Pgp в ГЭБ при гипоксии. В качестве модели изучаемой патологии нами была выбрана острая гипоксическая гипобарическая гипоксия у крыс Wistar. Согласно полученным результатам при гипоксии отмечен рост относительного количества Pgp, однако в то же время наблюдалось и увеличение степени проникновения фексофенадина через ГЭБ, что нехарактерно для повышенной функциональной активности белка-транспортера. Тем не менее, полученные данные соответствуют современным представлениям об изменении проницаемости ГЭБ под действием гипоксии и объясняются нарушением в нем целостности плотных контактов [163]. Результат показывает, что компенсаторного повышения количества Pgp при гипоксии недостаточно для нормализации увеличенной проницаемости ГЭБ вследствие повреждения плотных контактов и для предотвращения неизбежного проникновения веществ в головной мозг.

В дальнейшем было проанализировано воздействие ЭМГПС в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии на функциональную активность и относительное количество Pgp в ГЭБ. При гистохимической оценке уровня белка-транспортера в ГЭБ отмечалось отсутствие изменений при назначении ЭМГПС в условиях нормы, но при этом было обнаружено снижение функциональной

активности белка-транспортёра, что подтверждает полученный *in vitro* первоначальный результат о прямом ингибирующем влиянии тестируемого вещества.

При однократном в/в введении ЭМГПС в дозе 50 мг/кг перед гипоксическим воздействием было показано, что тестируемое вещество предотвращало увеличение относительного количества Pgp по сравнению с показателем нормы, но при этом не влияло на проницаемость ГЭБ: она оставалась выше значений интактных животных. Кроме того, при введении ЭМГПС перед моделированием патологии не наблюдалось изменения проницаемости ГЭБ относительно группы контроля гипоксии. Полученный результат может быть объяснён прямым ингибирующим влиянием ЭМГПС на функциональную активность Pgp, что компенсировало снижение проницаемости ГЭБ вследствие защиты его от повреждения в ходе развития окислительного стресса.

Для уточнения полученных результатов нами были проведены дальнейшие эксперименты, целью которых было выявление возможных механизмов влияния исследуемого вещества на Pgp в условиях гипоксии. С этой целью было оценено воздействие ЭМГПС на два транскрипционных фактора, играющих наиболее важную роль в патогенезе гипоксии и окислительного стресса и обеспечивающих развитие компенсаторных и адаптационных реакций — HIF-1 и Nrf2 [182; 215].

Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии приводило к увеличению относительного количества HIF-1 α в коре больших полушарий головного мозга крыс, что соответствует современным представлениям о патогенезе гипоксии [215] и свидетельствует об адекватности используемой модели. При введении ЭМГПС крысам не было отмечено изменения количества HIF-1 α ни в условиях нормы, ни в условиях гипоксии относительно показателей нормы. Данный результат, вероятно, связан с тем, что регуляция уровня и активности HIF-1 в клетке зависит преимущественно от внутриклеточной концентрации кислорода [176]. Отсутствие достоверного влияния тестируемого вещества на количество HIF-1 α в условиях

острой гипоксии объясняется тем, что ЭМГПС не влияет на концентрацию кислорода внутри клетки. Если рассматривать механизм антигипоксического действия изучаемого соединения, то его можно связать с наличием остатка янтарной кислоты в структуре. Сукцинат оказывает свой антигипоксический эффект преимущественно за счёт включения в работу цикла Кребса и синтеза молекулы ФАД*Н₂, способной поддерживать работу дыхательной цепи [69]. Также можно отметить, что у ЭМГПС отмечено наличие модулирующего влияния на ГАМК-эргические системы головного мозга, что потенциально может способствовать уменьшению энергетического дефицита в клетках за счёт дополнительного уменьшения их активности [5].

При острой гипоксической гипобарической гипоксии также отмечалось повышение количества транскрипционного фактора Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга крыс. Аналогичным образом ЭМГПС в условиях нормы не влиял на уровень данного транскрипционного фактора. Однако при введении ЭМГПС перед гипоксическим воздействием отмечалось более значительное повышение количества Nrf2 относительно группы контроля гипоксии, что может являться дополнительным звеном в механизме антиоксидантного действия препарата, обуславливающим его выраженные защитные свойства от свободнорадикального повреждения. Дополнительная стимуляция активности Nrf2 и нейротрофинов рассматривается как возможный способ лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера [177], хотя между уровнем экспрессии данного транскрипционного фактора и количеством нейротрофинов в мозге взаимосвязи обнаружено не было [172].

Гипотетически более сильное по сравнению с уровнем контрольной группы увеличение уровня Nrf2 под действием ЭМГПС в условиях гипоксии обусловлено несколькими механизмами.

Можно предположить, что ЭМГПС способен напрямую стабилизировать молекулу Nrf2, таким образом предотвращая её дальнейшую протеосомальную

деградацию. Данное свойство было зарегистрировано для ряда препаратов, например, для миноциклина [217]. Также в исследованиях была показана возможность сукцинирования Keap1 с последующей стабилизацией Nrf2 в клетках с нокаутом фумаратгидратазы [149].

Согласно другой гипотезе ЭМГП после взаимодействия со свободными радикалами переходит в форму, обладающую более высоким аффинитетом к Nrf2, при этом стабилизируя его и уменьшая протеосомальную деградацию данного транскрипционного фактора.

Оценку свободнорадикального статуса в коре больших полушарий головного мозга крыс проводили по определению концентраций ТБК-реактивных продуктов, уровня небелковых SH-групп, активности глутатион-S-трансферазы (G-tr) и глутатионпероксидазы (G-per). В ходе анализа было выявлено, что ЭМГПС препятствует повышению уровня ТБК-реактивных продуктов и снижению активности G-per. Также отмечалось значительное повышение уровня небелковых SH-групп при применении ЭМГПС по сравнению с показателями групп нормы и контроля гипоксии.

Полученные результаты в целом свидетельствуют о благоприятном влиянии ЭМГПС на свободнорадикальный статус коры головного мозга. Так, отсутствие статистически значимого повышения уровня ТБК-реактивных продуктов и уменьшение активности G-per относительно уровня у интактных животных свидетельствует о значительном снижении интенсивности перекисного окисления липидов, что, в свою очередь, говорит об уменьшении уровня повреждения клеток и обуславливает нейропротекторный эффект, подтверждая ранее полученные данные [11]. Повышение небелковых SH-групп свидетельствует об активации антиоксидантных защитных систем клетки, что особенно отчётливо проявилось на фоне развития гипоксии. Данный результат хорошо согласуется с другими полученными в ходе исследования сведениями о более высоком уровне активации

Nrf2 – фактора, повышение активности которого приводит к аналогичным изменениям [182]. Полученные результаты согласуются с данными литературы. Показано, что повышение экспрессии Nrf2 сопровождается увеличением активности глутатионпероксидазы [152].

Таким образом, в ходе данного исследования было выявлено, что ЭМГПС оказывает прямое ингибирующее влияние на активность Pgp, снижает активность белка-транспортёра локально в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс и предотвращает связанное с гипоксией повышение количества Pgp в ГЭБ. Помимо этого, было установлено, что несмотря на отсутствие влияния на транскрипционные факторы HIF-1 α и Nrf2 в условиях нормы, ЭМГПС способен увеличивать количество Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга крыс в условиях гипоксии.

ВЫВОДЫ

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

2. Разработан метод оценки активности гликопротеина-Р 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-Р 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-Р 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 внутривентрикулярное 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 внутривентрикулярное 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.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Проведение доклинических и клинических исследований комбинаций ЭМГПС с лекарственными препаратами, являющимися субстратами гликопротеина-Р, с целью оценки межлекарственных взаимодействий.
2. Подтверждение предполагаемого потенцирующего влияния ЭМГПС на эффективность других препаратов, использующихся в неврологической практике, на уровне клинических исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC_{0-t(мозг)} - площадь под кривой «концентрация в мозге-время»

AUC_{0-t(плазма)} - площадь под кривой «концентрация в плазме крови-время»

BDNF – мозговой нейротрофический фактор

G-per – глутатионпероксидаза

GSH – глутатион

G-tr – глутатион-S-трансфераза

HIF-1 – фактор 1, индуцируемый гипоксией

IC₅₀ – концентрация, ингибирующая активность Pgp на 50%

IGF – инсулиноподобный фактор роста

NGF – факторы роста нейронов

Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор

Pgp – гликопротеин-P

SD – стандартное отклонение

T_{1/2} – период полувыведения

TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли и вызывающий апоптоз лиганд

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

γ-GCS – глутамилцистеинсинтаза

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЛБ – гематоликворный барьер

ГПТБ – гидроперекись трет-бутила

ГТБ – гидроксид трет-бутила

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТНБ - дисульфид-5,5-дитиобис-2-нитробензоат

МДА – малоновый диальдегид

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАДФ*H₂ – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота

УДФ – уридиндифосфат

УФ-детектирование – ультрафиолетовое детектирование

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ХДНБ – 1-хлор-2,4-динитробензол

ЦНС – центральная нервная система

ЭМГП – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин

ЭМГПС – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян Г.Г. Новые подходы в лечении эпилепсии [Текст] / Г.Г. Авакян, Т.А. Воронина, С.А. Литвинова [и др.] // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* – 2017. – Т. 11, №3. – С. 15-22.
2. Бабиченко И.И. Новые методы иммунологической диагностики опухолевого роста: Учебное пособие / Бабиченко И.И., Ковязин В.А. // М.: РУДН В. – 2008. – 109 с.
3. Баранов П.А. Влияния мексидола на соотношение 6 β -гидрокортизол/свободный кортизол. Возможная индукция СYP3A4 [Текст] / П.А. Баранов, С.А. Апполонова, Г.М. Родченков [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2010. – Т. 73, №11. – С. 39-40.
4. Бобков Ю.Г. Методологические подходы к поиску фармакологических средств, эффективных при гипоксии и ишемии мозга [Текст] / Ю.Г. Бобков, И.А. Иванова // *Пат. физиол. и эксперим. терапия.* – 1987. – №6. – С. 13-19.
5. Воронина Т.А. Антиоксидант мексидол. Основные нейрпсихотропные эффекты и механизм действия [Текст] / Т.А. Воронина // *Психофармакология и биологическая наркология.* – 2001. – Т. 1, №1. – С. 2-12.
6. Воронина Т.А. Антиоксиданты/антигипоксанты – недостающий пазл эффективной патогенетической терапии пациентов с COVID-19 [Текст] / Т.А. Воронина // *Инфекционные болезни.* 2020. – Т.186, №2. – С. 97-103.
7. Воронина Т.А. Геропротективные эффекты этилметилгидроксипиридина сукцината в экспериментальном исследовании [Текст] / Т.А. Воронина // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2020. – Т. 120, №4. – С. 81-87.
8. Воронина Т.А. Изучение антистрессорного и анальгетического эффектов мексидола, диазепама, парацетамола и их комбинаций [Текст] / Т.А. Воронина, Г.М. Молодавкин, И.И. Бабаев [и др.] // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2006. – Т. 69, №4. – С. 6-9.

9. Воронина Т.А. Комбинированное применение мексидола с известными лекарственными средствами [Текст] / Т.А. Воронина, Е.А. Иванова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, №4. – С. 115-124.
10. Воронина Т.А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия [Текст] / Т.А. Воронина // Фарматека. – 2009. – Т. 6. – С. 28-31.
11. Воронина Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов [Текст] / Т.А. Воронина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – Т. 112, №12. – С. 86-90.
12. Воронина Т.А. Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике [Текст] / Т.А. Воронина // РМЖ. – 2016. – Т. 24, №7. – С. 434-438.
13. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. М.: Издательство Института биомедицинской химии, 1995. – 272 с.
14. Зайцев В.Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия [Текст] / В.Г. Зайцев, О.В. Островский, В.И. Закревский // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66, №4. – С. 66-70.
15. Каркищенко И.И., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика [Текст]. Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. – 284 с.
16. Кирова Ю.И. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении [Текст] / Ю.И. Кирова, Ф.М. Шакова, Э.Л. Германова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2020. – Т. 120, №1. – С. 62-69.
17. Кирова Ю.И. Новые аспекты энерготропного действия мексидола [Текст] / Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62, №4. – С. 36-40.

18. Кичерова О.А. Роль окислительного стресса в патогенезе неврологических заболеваний [Текст] / О.А. Кичерова, Л.И. Рейхерт // Медицинская наука и образование Урала. – 2019. – Т. 20, №2. – С. 192-195.
19. Косолапов В.А. Изучение антирадикальной активности новых соединений методами хемилюминесценций [Текст] / В.А. Косолапов, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, №3. – С. 287-294.
20. Кукес В.Г., Грачёв С.В., Сычёв Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 304 с.
21. Ланкин В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте [Текст] / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич // Докл. АН СССР. – 1976. – Т. 226, №3. – С. 705-708.
22. Ланкин В.З. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков // Кардиология. - 2001. - Т. 40, №7. - С. 48-61.
23. Литвицкий П.Ф. Гипоксия [Текст] / П.Ф. Литвицкий // Вопросы современной педиатрии. – 2016. – Т. 15, №1. – С. 45-58.
24. Лукьянова Л.Д. Сигнальная роль митохондрий при адаптации к гипоксии [Текст] / Л.Д. Лукьянова // Физиологический журнал. – 2013. – Т. 59, №6. – С. 141-154.
25. Ляхович В.В. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент (обзор) [Текст] / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Биохимия. – 2006. – Т. 71, №9. – С. 1183-1198.
26. Миронов А.Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III / А.Н. Миронов; под ред. А.Н. Миронова. – М.: Полиграф-Плюс, 2014. – 344 с.

27. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза: Решение совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 №65. Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/684cd00180c59c3878c6e686efe5f74b3e5b6e43/
28. Оковитый С.В. Антигипоксанты в современной клинической практике [Текст] / С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, В.А. Заплутанов, А.Н. Смагина // Клиническая медицина. – 2012. – Т. 90, №9. – С. 63-68.
29. Оковитый С.В., Радько С.В., Шустов Е.Б. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии [Текст] / С.В. Оковитый, С.В. Радько, Е.Б. Шустов // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, №9. – С. 3-7.
30. Островская Р.У. К механизму действия ноопепта: снижение активности стресс-индуцируемых протеинкиназ и активация экспрессии нейротрофинов [Текст] / Р.У. Островская, Ю.В. Вахитова, М.Х. Салимгареева [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73. – №. 12. – С. 2-5.
31. Перфилова В.Н. Влияние нового производного ГАМК на развитие окислительного стресса у крыс в условиях 30-минутной ишемии и реперфузии миокарда [Текст] / В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков, Т.А. Попова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, №9. – С. 8-12.
32. Полянский Н.Б. Ингибирование фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из сердца кролика оксипиридинами [Текст] / Н.Б. Полянский, Л.Д. Смирнов, А.А. Шведова [и др.] // Вопросы медицинской химии – 1983. – Т. 28, №1. – С. 123-127.
33. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: МедиаСфера, 2000. - 312 с
34. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К, 2019. — 328 с.

35. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. – М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014 – 344 с.
36. С. Гланц. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. — М., Практика, 1998. — 459 с
37. Сариев А.К. Кинетика выведения мексидола и его глюкуроноконъюгата с мочой больных [Текст] / А.К. Сариев, В.П. Жердев, А.А. Литвин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1999. – Т. 62, №5. – С. 42-46.
38. Сариев А.К. Фармакокинетика производных 3-оксипиридина в эксперименте: Автореф... дис. кан. мед. наук. — М.: 1987. — 23 с.
39. Середенин С.Б. Влияние мембраномодулятора 3-оксипиридина на эмоционально-стрессовую реакцию и связывание НЗ-диазепама в мозге инбредных мышей [Текст] / С.Б. Середенин, Ю.А. Бледнов, М.Л. Гордей [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1987. – Т. 2. – С. 134.
40. Совет Евразийской экономической комиссии. Решение от 3 ноября 2016 года №85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/
41. Соловьев Н.А. Экспериментально-клиническое исследование действия мексидола при некоторой патологии. Выяснение возможной локализации и механизма действия [Текст] / Н.А. Соловьев, В.В. Яснецов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 1. – С. 230-241.
42. 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.
43. Средство, активирующее транскрипционный фактор NIF // Патент России № RU 2602306 С2 / Серединин С.Б., Вахитова Ю.В., Островская Р.У., Гудашева Т.А.

44. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты [Текст] / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина. – 1977. – С. 66-68.
45. Теселкин Ю.О. Ингибирование мексидолом пероксидного окисления липопротеинов сыворотки крови [Текст] / Ю.О. Теселкин, Б.В. Давыдов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 1. – С. 139-143.
46. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток / Р.Я. Фрешни - М.: Лаборатория знаний, 2018. - 791 с.
47. Черных И.В. Влияние альфузозина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте [Текст] / И.В. Черных, Е.Н. Якушева // Актуальные вопросы клинической урологии. – 2013. – С. 115-117.
48. Черных И.В. Влияние отечественных нейропротекторных средств на функциональную активность ABCB1-белка [Текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога [и др.] // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. ИП Павлова с международным участием. – 2017. – С. 370-371.
49. Черных И.В. Метод анализа функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере [текст] / И.В. Черных, А.В. Щулькин, П.Ю. Мыльников [и др.] // Нейрохимия. – 2019. – Т. 36, №. 1. – С. 84-88.
50. Щулькин А.В. Влияние мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности нейронов *in vitro* [Текст] / А.В. Щулькин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – Т. 112, №2. – С. 35-39.
51. Щулькин А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики [Текст] / А.В. Щулькин // Фарматека. – 2016. – №S4. – С. 65-71.
52. Щулькин А.В. Распределение мексидола в структурах головного мозга, его клеточных элементах и субклеточных фракциях [Текст] / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – №. 8. – С. 70-73.

53. Щулькин А.В. Сравнение фармакокинетических параметров препарата мексидол с препаратом этилметилгидроксипиридина сукцинат [Текст] / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. – 2014. – Т. 114, №11. – С. 40-43.
54. Якушева Е.Н. Влияние афобазола на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-Р в эксперименте [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин, М.В. Гацанога // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, №9. – С. 69-72.
55. Якушева Е.Н. Влияние гликвидона на экспрессию гликопротеина-Р на фоне нормы и на фоне экспериментального аллоксан-индуцированного сахарного диабета 2-го типа [Текст] / Е.Н. Якушева, Д.С. Титов // Наука молодых – Eruditio Juvenium. – 2017. – Т. 5, №2. – С. 208-224.
56. Якушева Е.Н. Влияние комбинации этинилэстрадиола и гестодена на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева, А.А. Котлярова, А.В. Щулькин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, №6. – С. 15-19.
57. 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.
58. 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.
59. Якушева Е.Н. Влияние тиамазола на функциональную активность гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева, А.С. Бирюкова, А.В. Щулькин // Научные

ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – Т. 18, №10-3 (129). – С. 133-138.

60. Якушева Е.Н. Дозозависимое влияние тироксина на функциональную активность гликопротеина-Р в эксперименте [Текст] / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, А.С. Бирюкова // Биомедицина. – 2012. – №2. – С. 53-60.

61. Якушева Е.Н. Изменение функциональной активности гликопротеина-Р при экспериментальном гипертиреозе [Текст] / Е.Н. Якушева, А.С. Бирюкова, А.В. Щулькин // БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики. Сборник научных трудов. – Минск: Белорусский государственный медицинский университет, 2011. – С. 96.

62. Якушева Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р [Текст] / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.В. Черных // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, №5. – С. 19-23.

63. Якушева Е.Н. Функциональная активность и экспрессия гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях [Текст] / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.В. Черных [и др.] // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. – №. 2. – С. 75.

64. Якушева Е.Н. Характеристика гликопротеина-Р как белка транспортера лекарственных веществ [Текст] / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.С. Бирюкова // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2011. – Т. 19, №3. – С. 142-148.

65. Яснецов В.В. Влияние некоторых нейротропных веществ на дыхание митохондрий клеток головного мозга крыс [Текст] / В.В. Яснецов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2009. – №. 2 (30). – С. 72-73.

66. Яснецов В.В. Действие семакса и мексидола на моделях ишемии мозга у крыс [Текст] / В.В. Яснецов, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, №1. – С. 68-70.
67. Abbott N.J. Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability [Text] / N.J. Abbott // Journal of anatomy. – 2002. – Т. 200, №5. – С. 523-534.
68. Abbott N.J. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier [Text] / N.J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson // Nature reviews neuroscience. – 2006. – Т. 7, №1. – С. 41.
69. Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism [Text] / M. Akram // Cell biochemistry and biophysics. – 2014. – Т. 68, №3. – С. 475-478.
70. Alam J. Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor [Text] / J. Alam, C. Wicks, D. Stewart [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Т. 275, №36. – С. 27694-27702.
71. Aller S.G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding [Text] / S.G. Aller, J. Yu, A. Ward [et al.] // Science. – 2009. – Т. 323, №5922. – С. 1718-1722.
72. Arany Z. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia [Text] / Z. Arany, L.E. Huang, R. Eckner [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1996. – Т. 93, №23. – С. 12969-12973.
73. Armulik A. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises [Text] / A. Armulik, G. Genové, C. Betsholtz // Developmental cell. – 2011. – Т. 21, №2. – С. 193-215.
74. Aronica E. Cerebral expression of drug transporters in epilepsy [Text] / E. Aronica, S.M. Sisodiya, J.A. Gorter // Advanced drug delivery reviews. – 2012. – Т. 64, №10. – С. 919-929.

75. Balogun E. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element [Text] / E. Balogun, M. Hoque, P. Gong [et al.] // *Biochemical Journal*. – 2003. – T. 371, №3. – C. 887-895.
76. Bernaudin M. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain [Text] / M. Bernaudin, A.S. Nedelec, D. Divoux [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2002. – T. 22, №4. – C. 393-403.
77. Betz A.L. Hexose transport in microvascular endothelial cells cultured from bovine retina [Text] / A.L. Betz, P.D. Bowman, G.W. Goldstein // *Experimental eye research*. – 1983. – T. 36, №2. – C. 269-277.
78. Bloom D.A. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD (P) H: quinone oxidoreductase-1 gene expression [Text] / D.A. Bloom, A.K. Jaiswal // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278, №45. – C. 44675-44682.
79. Bocci G. New insights in the in vitro characterisation and molecular modelling of the P-glycoprotein inhibitory promiscuity [Text] / G. Bocci, A. Moreau, P. Vayer [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – T. 121. – C. 85-94.
80. Boulay A.C. Immune quiescence of the brain is set by astroglial connexin 43 [Text] / A.C. Boulay, A. Mazeraud, S. Cisternino [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2015. – T. 35, №10. – C. 4427-4439.
81. Brandes M.S. NRF2 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases [Text] / M.S. Brandes, N.E. Gray // *ASN neuro*. – 2020. – T. 12. – C. 1759091419899782.

82. Brasnjevic I. Delivery of peptide and protein drugs over the blood–brain barrier [Text] / I. Brasnjevic, H.W. Steinbusch, C. Schmitz [et al.] // *Progress in neurobiology*. – 2009. – T. 87, №4. – C. 212-251.
83. Broadwell R.D. Transcytotic pathway for blood-borne protein through the blood-brain barrier [Text] / R.D. Broadwell, B.J. Balin, M. Salcman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – T. 85, №2. – C. 632-636.
84. Broman T. The possibilities of the passage of substances from the blood to the central nervous system (Is there a Blood-Brain-Barrier and a Blood-Cerebrospinal Fluid-Barrier?) [Text] / T. Broman // *Acta Psychiatrica Scandinavica*. – 1941. – T. 16, №1. – C. 1-25.
85. Brouns R. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke [Text] / R. Brouns, P.P. De Deyn // *Clinical neurology and neurosurgery*. – 2009. – T. 111, №6. – C. 483-495.
86. Buckley B.J. Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium [Text] / B.J. Buckley, Z.M. Marshall, A.R. Whorton // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2003. – T. 307, №4. – C. 973-979.
87. Cai Z. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury [Text] / Z. Cai, D.J. Manalo, G. Wei [et al.] // *Circulation*. – 2003. – T. 108, №1. – C. 79-85.
88. Chan J.Y. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein [Text] / J.Y. Chan, M. Kwong // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. – 2000. – T. 1517, №1. – C. 19-26.
89. Chan K. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice [Text] / K. Chan, Y.W. Kan // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – T. 96, №22. – C. 12731-12736.
90. Chen S.H., Liu K.M. Methods for layout verification for polysilicon cell edge structures in FinFET standard cells: пат. 8943455 США. – 2015.

91. Cheslow L. Glial-endothelial crosstalk regulates blood–brain barrier function [Text] / L. Cheslow, J.I. Alvarez // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2016. – T. 26. – C. 39-46.
92. Cho H.Y. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice [Text] / H.Y. Cho, A.E. Jedlicka, S.P. Reddy [et al.] // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 2002. – T. 26, №2. – C. 175-182.
93. Cordaro M. Physiological and Biochemical Changes in NRF2 Pathway in Aged Animals Subjected to Brain Injury [Text] / M. Cordaro, R. D’Amico, R. Morabito [et al.] // *Cell Physiol. Biochem*. – 2021. – T. 55. – C. 160-179.
94. Cuddapah V.A. Regulation of the blood–brain barrier by circadian rhythms and sleep [Text] / V.A. Cuddapah, S.L. Zhang, A. Sehgal // *Trends in neurosciences*. – 2019. – T. 42, №7. – C. 500-510.
95. Cullinan S.B. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival [Text] / S.B. Cullinan, D. Zhang, M. Hannink [et al.] // *Molecular and cellular biology*. – 2003. – T. 23, №20. – C. 7198-7209.
96. Daneman R. The Blood-Brain Barrier [Text] / R. Daneman, A. Prat // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2015. – T. 7, №1. – C. a020412.
97. Daneman R. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells [Text] / R. Daneman, L. Zhou, D. Agalliu [et al.] // *PloS one*. – 2010. – T. 5, №10. – C. e13741.
98. Dastvan R. Mechanism of allosteric modulation of P-glycoprotein by transport substrates and inhibitors [Text] / R. Dastvan, S. Mishra, Y.B. Peskova [et al.] // *Science*. – 2019. – T. 364, №6441. – C. 689-692.
99. Davson H.J. Review. Lecture, the blood barrier [Text] / H.J. Davson // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1976. – T. 255. – C. 1-28.
100. Demeule M. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood–brain barrier [Text] / M. Demeule, A. Régina, J. Jodoin [et al.] // *Vascular pharmacology*. – 2002. – T. 38, №6. – C. 339-348.

101. Déry M.A.C. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators [Text] / M.A.C. Déry, M.D. Michaud, D.E. Richard // The international journal of biochemistry & cell biology. – 2005. – T. 37, №3. – C. 535-540.
102. Di L. Strategies to assess blood–brain barrier penetration [Text] / L. Di, E.H. Kerns, G.T. Carter // Expert opinion on drug discovery. – 2008. – T. 3, №6. – C. 677-687.
103. Ding X. Correlation between C3435T locus of ABCB1 gene and poststroke depression in China [Text] / X. Ding, Q. Yang, L. Su [et al.] // DNA and cell biology. – 2019. – T. 38, №8. – C. 808-813.
104. Dinkova-Kostova A.T. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups [Text] / A.T. Dinkova-Kostova, M.A. Massiah, R.E. Bozak [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98, №6. – C. 3404-3409.
105. Dinkova-Kostova A.T. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants [Text] / A.T. Dinkova-Kostova, W.D. Holtzclaw, R.N. Cole [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99, №18. – C. 11908-11913.
106. e Silva K.S.F. Genetic polymorphisms in patients with epilepsy: a mini review [Text] / K.S.F. e Silva // International epilepsy journal. – 2018. – T. 1. – №. 1. – C. 1-7.
107. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups [Text] / G.L. Ellman // Archives of biochemistry and biophysics. – 1959. – T. 82, №1. – C. 70-77.
108. Elsby R. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions [Text] / R. Elsby, D.D. Surry, V.N. Smith [et al.] // Xenobiotica. – 2008. – T. 38, №7-8. – C. 1140-1164.
109. Engelhardt B. Novel insights into the development and maintenance of the blood–brain barrier [Text] / B. Engelhardt, S. Liebner // Cell and tissue research. – 2014. – T. 355, №3. – C. 687-699.

110. Esser L. Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity [Text] / L. Esser, F. Zhou, K.M. Shiloach [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – Т. 292, №2. – С. 446-461.
111. European medicines agency (EMA), Guideline on bioanalytical method validation. Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
112. Ezan P. Deletion of astroglial connexins weakens the blood–brain barrier [Text] / P. Ezan, P. André, S. Cisternino [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2012. – Т. 32, №8. – С. 1457-1467.
113. Fan Y. Alterations in expression and function of ABC family transporters at blood-brain barrier under liver failure and their clinical significances [Text] / Y. Fan, X. Liu // *Pharmaceutics*. – 2018. – Т. 10, №3. – С. 102.
114. Fang Y. HIF-1 α mediates TRAIL-induced neuronal apoptosis via regulating DcR1 expression following traumatic brain injury [Text] / Y. Fang, J. Lu, X. Wang [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2020. – Т. 14. – С. 192.
115. FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation (draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018. Режим доступа: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
116. Ferreira R.J. Molecular docking characterizes substrate-binding sites and efflux modulation mechanisms within P-glycoprotein [Text] / R.J. Ferreira, M.J.U. Ferreira, D.J. dos Santos // *Journal of chemical information and modeling*. – 2013. – Т. 53, №7. – С. 1747-1760.
117. Ferry D.R. P-glycoprotein possesses a 1, 4-dihydropyridine-selective drug acceptor site which is allosterically coupled to a vinca-alkaloid-selective binding site [Text] / D.R.

- Ferry, M.A. Russell, M.H. Cullen // Biochemical and biophysical research communications. – 1992. – T. 188, №1. – C. 440-445.
118. Forlani L. Reinvestigation of the tautomerism of some substituted 2-hydroxypyridines [Text] / L. Forlani, G. Cristoni, C. Boga [et al.] // Arkivoc. – 2002. – T. 11. – C. 198-215.
119. Friedemann U. Blood-brain barrier [Text] / U. Friedemann // Physiological reviews. – 1942. – T. 22, №2. – C. 122-245.
120. Fu B.M. Transport across the blood-brain barrier [Text] / B.M. Fu // Molecular, Cellular, and Tissue Engineering of the Vascular System. – 2018. – C. 235-259.
121. Fuhrich D.G. Comparison of HSCORE assessment of endometrial $\beta 3$ integrin subunit expression with digital HSCORE using computerized image analysis (ImageJ) [Text] / Fuhrich D.G., Lessey B.A., Savaris R.F. // Anal. Quant. Cytopathol. Histopathol. – 2013. – T. 35, №4. – C. 210–216.
122. Geier E.G. Profiling solute carrier transporters in the human blood–brain barrier [Text] / E.G. Geier, E.C. Chen, A. Webb [et al.] // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2013. – T. 94, №6. – C. 636-639.
123. Gil-Martins E. Dysfunction of ABC transporters at the blood-brain barrier: Role in neurological disorders [Text] / E. Gil-Martins, D.J. Barbosa, V. Silva [et al.] // Pharmacology & Therapeutics. – 2020. – T. 213. – C. 107554.
124. Golden P.L. Brain microvascular P-glycoprotein and a revised model of multidrug resistance in brain [Text] / P.L. Golden, W.M. Pardridge // Cellular and molecular neurobiology. – 2000. – T. 20, №2. – C. 165-181.
125. Golden P.L. P-Glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries [Text] / P.L. Golden, W.M. Pardridge // Brain research. – 1999. – T. 819, №1-2. – C. 143-146.
126. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency (EMA). 2011. Режим доступа: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>

127. Hagenbuch B. Transport of xenobiotics across the blood-brain barrier [Text] / B. Hagenbuch, B. Gao, P.J. Meier // *Physiology*. – 2002. – Т. 17, №6. – С. 231-234.
128. Hall C.N. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease [Text] / C.N. Hall, C. Reynell, B. Gesslein [et al.] // *Nature*. – 2014. – Т. 508, №7494. – С. 55-60.
129. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine [Text] / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // *Free radicals in biology and medicine*. – 2015. – №. Ed. 5.
130. Ho T.K. Increased endogenous angiogenic response and hypoxia-inducible factor-1 α in human critical limb ischemia [Text] / T.K. Ho, V. Rajkumar, M. Ponticos [et al.] // *Journal of vascular surgery*. – 2006. – Т. 43, №1. – С. 125-133.
131. Huang H.C. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2 [Text] / H.C. Huang, T. Nguyen, C.B. Pickett // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Т. 97, №23. – С. 12475-12480.
132. Huang L.E. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway [Text] / L.E. Huang, J. Gu, M. Schau [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Т. 95, №14. – С. 7987-7992.
133. In vitro metabolism and transporter-mediated drug-drug interaction studies. Guidance for Industry. 2020. Режим доступа: <https://www.fda.gov/media/134582/download>
134. Ishii T. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages [Text] / T. Ishii, K. Itoh, S. Takahashi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Т. 275, №21. – С. 16023-16029.
135. Itoh K. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements [Text] / K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1997. – Т. 236, №2. – С. 313-322.

136. Itoh K. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 [Text] / K. Itoh, M. Mochizuki, Y. Ishii [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 2004. – T. 24, №1. – C. 36-45.
137. Jaisue S. Pharmacokinetics of fexofenadine following LPS administration to rats [Text] / S. Jaisue, J.P. Gerber, A.K. Davey // *Xenobiotica*. – 2010. – T. 40, №11. – C. 743-750.
138. Jiang Q. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) mediates NLRP3 inflammasome-dependent-pyroptotic and apoptotic cell death following ischemic stroke [Text] / Q. Jiang, X. Geng, J. Warren [et al.] // *Neuroscience*. – 2020. – T. 448. – C. 126-139.
139. Juliano R.L. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [Text] / R.L. Juliano, V. Ling // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1976. – T. 455, №1. – C. 152-162.
140. Kadota Y. Neuro-hemal and neuro-glial specificities in the neural lobe of the pituitary gland [Text] / Y. Kadota, S. ichi Tsubaki, S. Wakai [et al.] // *Progress in Brain Research*. – Elsevier, 1992. – T. 91. – C. 357-365.
141. Kang K.A. Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance [Text] / K.A. Kang, J.W. Hyun // *Toxicological research*. – 2017. – T. 33, №1. – C. 1-5.
142. Kang K.W. Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction [Text] / K.W. Kang, S.H. Choi, S.G. Kim // *Nitric Oxide*. – 2002. – T. 7, №4. – C. 244-253.
143. Kaspar J.W. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress [Text] / J.W. Kaspar, S.K. Niture, A.K. Jaiswal // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2009. – T. 47, №9. – C. 1304-1309.
144. Kay G.G. The effects of antihistamines on cognition and performance [Text] / G.G. Kay // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2000. – T. 105, №6. – C. S622-S627.

145. Kealy J. Blood-brain barrier regulation in psychiatric disorders [Text] / J. Kealy, C. Greene, M. Campbell // *Neuroscience letters*. – 2020. – T. 726. – C. 133664.
146. Keen J.H. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases [Text] / J.H. Keen, W.H. Habig, W.B. Jakoby // *Journal of Biological Chemistry*. – 1976. – T. 251, №20. – C. 6183-6188.
147. Kim Y.C. Hemin-induced Activation of the Thioredoxin Gene by Nrf2 A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors [Text] / Y.C. Kim, H. Masutani, Y. Yamaguchi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – T. 276, №21. – C. 18399-18406.
148. Kim Y. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation [Text] / Y. Kim, J. Chen // *Science*. – 2018. – T. 359, №6378. – C. 915-919.
149. Kinch L. Succination of Keap1 and activation of Nrf2-dependent antioxidant pathways in FH-deficient papillary renal cell carcinoma type 2 [Text] / L. Kinch, N.V. Grishin, J. Brugarolas // *Cancer cell*. – 2011. – T. 20, №4. – C. 418-420.
150. Kiruba G.S.M. Tautomeric equilibria of Pyridoxal-5-phosphate (Vitamin B6) and 3-Hydroxypyridine derivatives: A theoretical study of solvation effects [Text] / G.S.M. Kiruba, M.W. Wong // *The Journal of organic chemistry*. – 2003. – T. 68, №7. – C. 2874-2881.
151. Klimecki W.T. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers [Text] / W.T. Klimecki, B.W. Futscher, T.M. Grogan [et al.] // *Blood*. – 1994. – T. 83, №9. – C. 2451-2458.
152. Kobayashi M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation [Text] / M. Kobayashi, M. Yamamoto // *Antioxidants & redox signaling*. – 2005. – T. 7, №3-4. – C. 385-394.
153. Kuai Z. Effects of insulin on transcriptional response and permeability in an in vitro model of human blood-brain barrier [Text] / Z. Kuai, Y. Xu, Q. Zhao [et al.] // *Journal of cellular biochemistry*. – 2018. – T. 119, №7. – C. 5657-5664.

154. Kumar G.L., Rudbeck L. Immunohistochemical methods // Пер. с англ. под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова – М.: 2011. – 224 с.
155. Kwak M.K. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones [Text] / M.K. Kwak, P.A. Egner, P.M. Dolan [et al.] // Mutation research / Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. – 2001. – Т. 480. – С. 305-315.
156. Langen U.H. Development and cell biology of the blood-brain barrier [Text] / U.H. Langen, S. Ayloo, C. Gu // Annual review of cell and developmental biology. – 2019. – Т. 35. – С. 591-613.
157. Li J. HIF-1 α attenuates neuronal apoptosis by upregulating EPO expression following cerebral ischemia-reperfusion injury in a rat MCAO model [Text] / J. Li, T. Tao, J. Xu [et al.] // International journal of molecular medicine. – 2020. – Т. 45, №4. – С. 1027-1036.
158. Liebner S. Current concepts of blood-brain barrier development [Text] / S. Liebner, C.J. Czupalla, H. Wolburg // International Journal of Developmental Biology. – 2011. – Т. 55, №4-5. – С. 467-476.
159. Liebner S. Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease [Text] / S. Liebner, R.M. Dijkhuizen, Y. Reiss [et al.] // Acta neuropathologica. – 2018. – Т. 135, №3. – С. 311-336.
160. Lin J.H. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics [Text] / J.H. Lin, M. Yamazaki // Clinical pharmacokinetics. – 2003. – Т. 42, №1. – С. 59-98.
161. Liu X. SLC family transporters [Text] / X. Liu // Advances in experimental medicine and biology. – 2019. – Т. 1141 – С. 101-202.
162. Llor J. Thermodynamic characterization of tautomeric equilibria by multinuclear magnetic resonance. Application to 3-hydroxypyridine [Text] / J. Llor, O. Lopez-Mayorga, L. Muñoz // Magnetic resonance in chemistry. – 1993. – Т. 31, №6. – С. 552-556.
163. Lochhead J.J. Hypoxic stress and inflammatory pain disrupt blood-brain barrier tight junctions: implications for drug delivery to the central nervous system [Text] / J.J. Lochhead, P.T. Ronaldson, T.P. Davis // The AAPS journal. – 2017. – Т. 19, №4. – С. 910-920.

164. Loo T.W. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux [Text] / T.W. Loo, D.M. Clarke // *The Journal of membrane biology*. – 2005. – T. 206, №3. – C. 173-185.
165. Löscher W. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs [Text] / W. Löscher, H. Potschka // *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 2002. – T. 301, №1. – C. 7-14.
166. Macfarland A. Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta [Text] / A. Macfarland, D.R. Abramovich, S.W. Ewen [et al.] // *The Histochemical journal*. – 1994. – T. 26, №5. – C. 417-423.
167. Małkiewicz M.A. Blood-brain barrier permeability and physical exercise [Text] / M.A. Małkiewicz, A. Szarmach, A. Sabisz [et al.] // *Journal of neuroinflammation*. – 2019. – T. 16, №1. – C. 1-16.
168. Markus H.S. Cerebral perfusion and stroke [Text] / H.S. Markus // *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*. – 2004. – T. 75, №3. – C. 353-361.
169. Marroni M. Vascular and parenchymal mechanisms in multiple drug resistance: a lesson from human epilepsy [Text] / M. Marroni, N. Marchi, L. Cucullo [et al.] // *Current drug targets*. – 2003. – T. 4, №4. – C. 297-304.
170. Mayor D. Neurotransmitters in the mediation of cerebral ischemic injury [Text] / D. Mayor, M. Tymianski // *Neuropharmacology*. – 2018. – T. 134. – C. 178-188.
171. McIntosh J., Fildes P. The factors which govern the penetration of arsenic (salvarsan) and aniline dyes into the brain and their bearing upon the treatment of cerebral syphilis [Text] / J. McIntosh, P. Fildes // *Brain*. – 1916. – T. 39, №3-4. – C. 478-483.
172. Mendez-David I. Nrf2-signaling and BDNF: a new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression [Text] / I. Mendez-David, L. Trishler, Z. El Ali [et al.] // *Neuroscience letters*. – 2015. – T. 597. – C. 121-126.

173. Metzler D.E. Spectra of 3-hydroxypyridines. Band-shape analysis and evaluation of tautomeric equilibriums [Text] / D.E. Metzler, C.M. Harris, R.J. Johnson [et al.] // *Biochemistry*. – 1973. – T. 12, №26. – C. 5377-5392.
174. Minuesa G. P-glycoprotein (ABCB1) activity decreases raltegravir disposition in primary CD4+ P-gphigh cells and correlates with HIV-1 viral load [Text] / G. Minuesa, C. Arimany-Nardi, I. Erkizia [et al.] // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2016. – T. 71, №10. – C. 2782-2792.
175. Mohammadzadeh R. Reduced ABCB1 expression and activity in the presence of acrylic copolymers [Text] / R. Mohammadzadeh, B. Baradaran, H. Valizadeh [et al.] // *Advanced pharmaceutical bulletin*. – 2014. – T. 4, №3. – C. 219.
176. Mole D.R. Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing [Text] / D.R. Mole, P.H. Maxwell, C.W. Pugh [et al.] // *IUBMB life*. – 2001. – T. 52, №1. – C. 43-47.
177. Murphy K.E., Park J.J. Can co-activation of Nrf2 and neurotrophic signaling pathway slow Alzheimer's disease? [Text] / K.E. Murphy, J.J. Park // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – T. 18. – №. 6. – C. 1168.
178. Nagasawa K. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells [Text] / K. Nagasawa, H. Chiba, H. Fujita [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2006. – T. 208, №1. – C. 123-132.
179. Nakaso K. PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells [Text] / K. Nakaso, H. Yano, Y. Fukuhara [et al.] // *FEBS letters*. – 2003. – T. 546, №2-3. – C. 181-184.
180. Nałęcz K.A. Solute carriers in the blood–brain barrier: safety in abundance [Text] / K.A. Nałęcz // *Neurochemical research*. – 2017. – T. 42, №3. – C. 795-809.
181. Nandigama K. Large-scale purification of functional human P-glycoprotein (ABCB1) [Text] / K. Nandigama, S. Lusvardi, S. Shukla [et al.] // *Protein expression and purification*. – 2019. – T. 159. – C. 60-68.

182. Niki E. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants [Text] / E. Niki, N. Noguchi, N. Gotoh // Biochemical Society transactions. – 1993. – T. 21, №2. – C. 313.
183. Numazawa S. Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress [Text] / S. Numazawa, M. Ishikawa, A. Yoshida [et al.] // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2003. – T. 285, №2. – C. C334-C342.
184. Obermeier B. The blood–brain barrier [Text] / B. Obermeier, A. Verma, R.M. Ransohoff // Handbook of clinical neurology. – 2016. – T. 133. – C. 39-59.
185. Orthmann A. Improving the transport of chemotherapeutic drugs across the blood–brain barrier [Text] / A. Orthmann, I. Fichtner, R. Zeisig // Expert review of clinical pharmacology. – 2011. – T. 4, №4. – C. 477-490.
186. Owen A. Induction of P-glycoprotein in lymphocytes by carbamazepine and rifampicin: the role of nuclear hormone response elements [Text] / A. Owen, C. Goldring, P. Morgan [et al.] // British journal of clinical pharmacology. – 2006. – T. 62, №2. – C. 237-242.
187. Pagé E.L. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms [Text] / E.L. Pagé, G.A. Robitaille, J. Pouysségur [et al.] // Journal of biological chemistry. – 2002. – T. 277, №50. – C. 48403-48409.
188. Paglia D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase [Text] / D.E. Paglia, W.N. Valentine // The Journal of laboratory and clinical medicine. – 1967. – T. 70, №1. – C. 158-169.
189. Pahlajani S. Neurovascular dysfunction with BBB hyperpermeability related to the pathophysiology of major depressive disorder [Text] / S. Pahlajani, S. Najjar // Inflammation and Immunity in Depression. – Academic press, 2018. – C. 61-83.
190. Pardridge W.M. Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein [Text] / W.M. Pardridge, P.L. Golden, Y.S. Kang [et al.] // Journal of neurochemistry. – 1997. – T. 68, №3. – C. 1278-1285.

191. Pardridge W.M. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery [Text] / W.M. Pardridge // Expert opinion on drug delivery. – 2016. – T. 13, №7. – C. 963-975.
192. Pardridge W.M. Evaluation of cationized rat albumin as a potential blood-brain barrier drug transport vector [Text] / W.M. Pardridge, D. Triguero, J. Buciak [et al.] // Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 1990. – T. 255, №2. – C. 893-899.
193. Pardridge W.M. New approaches to drug delivery through the blood-brain barrier [Text] / W.M. Pardridge // Trends in biotechnology. – 1994. – T. 12, №6. – C. 239-245.
194. Petri N. Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model [Text] / N. Petri, C. Tannergren, D. Rungstad [et al.] // Pharmaceutical research. – 2004. – T. 21, №8. – C. 1398-1404.
195. Pietsch E.C. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones [Text] / E.C. Pietsch, J.Y. Chan, F.M. Torti [et al.] // Journal of biological chemistry. – 2003. – T. 278, №4. – C. 2361-2369.
196. Pong S. Brain microvascular endothelial cell dysfunction in schizophrenia: предварительный отчёт: дис. – 2020.
197. Qosa H. Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders [Text] / H. Qosa, D.S. Miller, P. Pasinelli [et al.] // Brain research. – 2015. – T. 1628. – C. 298-316.
198. Rana S.V. Effect of different oral doses of isoniazid-rifampicin in rats [Text] / S.V. Rana, R. Pal, K. Vaiphie [et al.] // Molecular and cellular biochemistry. – 2006. – T. 289, №1. – C. 39-47.
199. Rebar E.J. Development of pro-angiogenic engineered transcription factors for the treatment of cardiovascular disease [Text] / E.J. Rebar // Expert opinion on investigational drugs. – 2004. – T. 13, №7. – C. 829-839.
200. Reese T.S. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase [Text] / T.S. Reese, M.J. Karnovski // The Journal of cell biology. – 1967. – T. 34, №1. – C. 207-217.

201. Riede J. Examining P-gp efflux kinetics guided by the BDDCS–Rational selection of in vitro assay designs and mathematical models [Text] / J. Riede, K.I. Umehara, P. Schweigler [et al.] // *European journal of pharmaceutical sciences*. – 2019. – T. 132. – C. 132-141.
202. Robillard K.R. Expression of ATP-binding cassette membrane transporters in a HIV-1 transgenic rat model [Text] / K.R. Robillard, M.T. Hoque, R. Bendayan // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2014. – T. 444, №4. – C. 531-536.
203. Rogawski M.A. AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy [Text] / M.A. Rogawski // *Acta neurologica scandinavica*. – 2013. – T. 127. – C. 9-18.
204. Rubin L.L. The cell biology of the blood-brain barrier [Text] / L.L. Rubin, J.M. Staddon // *Annual review of neuroscience*. – 1999. – T. 22, №1. – C. 11-28.
205. Ruifrok A.C. Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding [Text] / A.C. Ruifrok // *Analytical and quantitative cytology and histology*. – 1997. – T. 19, №2. – C. 107-113.
206. Sasaki H. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression [Text] / H. Sasaki, H. Sato, K. Kuriyama-Matsumura [et al.] // *Journal of biological chemistry*. – 2002. – T. 277, №47. – C. 44765-44771.
207. Sawchuk R.J. Microdialysis in the study of drug transporters in the CNS [Text] / R.J. Sawchuk, W.F. Elmquist // *Advanced drug delivery reviews*. – 2000. – T. 45, №2-3. – C. 295-307.
208. Scheffer G.L. Drug resistance molecules: lessons from oncology [Text] / G.L. Scheffer, R.J. Scheper // *Novartis foundation symposium*. – 2002. – T. 243. – C. 19-185.
209. Scherrmann J.M. Drug delivery to brain via the blood–brain barrier [Text] / J.M. Scherrmann // *Vascular pharmacology*. – 2002. – T. 38, №6. – C. 349-354.
210. Schinkel A.H. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs [Text] / A.H. Schinkel, J.J.M. Smit, M. van Tellingen [et al.] // *Cell*. – 1994. – T. 77, №4. – C. 491-502.

211. Schinkel A.H. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood–brain barrier [Text] / A.H. Schinkel // *Advanced drug delivery reviews*. – 1999. – T. 36, №2-3. – C. 179-194.
212. Schinkel A.H. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview [Text] / A.H. Schinkel, J. W. Jonker // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – T. 64. – C. 138-153.
213. Schlachetzki F. P-glycoprotein and caveolin-1 α in endothelium and astrocytes of primate brain [Text] / F. Schlachetzki, W.M. Pardridge // *Neuroreport*. – 2003. – T. 14. – №. 16. – C. 2041-2046.
214. Sekhar K.R. Nrf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by KIAA0132, the human homolog to INrf2 [Text] / K.R. Sekhar, X.X. Yan, M.L. Freeman // *Oncogene*. – 2002. – T. 21, №44. – C. 6829-6834.
215. Semenza G.L. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases [Text] / G.L. Semenza, F. Agani, D. Feldser [et al.] // *Oxygen sensing*. – 2002. – C. 123-130.
216. Senior A.E., Al-Shawi M.K., Urbatsch I.L. ATP hydrolysis by multidrug-resistance protein from Chinese hamster ovary cells [Text] / A.E. Senior, M.K. Al-Shawi, I.L. Urbatsch // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. – 1995. – T. 27, №1. – C. 31-36.
217. Shahzad K. Stabilization of endogenous Nrf2 by minocycline protects against Nlrp3-inflammasome induced diabetic nephropathy [Text] / K. Shahzad, F. Bock, I. Gadi [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – T. 6, №1. – C. 1-14.
218. Sharom F.J. The P-glycoprotein multidrug transporter [Text] / F.J. Sharom // *Essays in biochemistry*. – 2011. – T. 50. – C. 161-178.
219. Shen Y. Inhibition of HIF-1 α reduced blood brain barrier damage by regulating MMP-2 and VEGF during acute cerebral ischemia [Text] / Y. Shen, J. Gu, Z. Liu [et al.] // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2018. – T. 12. – C. 288.
220. Singh S.N. Effect of high altitude (7,620 m) exposure on glutathione and related metabolism in rats [Text] / S.N. Singh, P. Vats, M.M. Cumria [et al.] // *European journal of applied physiology*. – 2001. – T. 84, №3. – C. 233-237.

221. Sisodiya S.M. Mechanisms of antiepileptic drug resistance [Text] / S.M. Sisodiya // Current opinion in neurology. – 2003. – T. 16, №2. – C. 197-201.
222. Sohet F. LSR/angulin-1 is a tricellular tight junction protein involved in blood–brain barrier formation [Text] / F. Sohet, C. Lin, R.N. Munji [et al.] // Journal of Cell Biology. – 2015. – T. 208, №6. – C. 703-711.
223. Song K. Oxidative Stress-Mediated Blood-Brain Barrier (BBB) Disruption in Neurological Diseases [Text] / K. Song, Y. Li, H. Zhang [et al.] // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2020. – T. 2020. – C. 4356386.
224. Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation [Text] / L. Sorokin // Nature reviews immunology. – 2010. – T. 10, №10. – C. 712-723.
225. Srinivasan B. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems [Text] / B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch [et al.] // Journal of laboratory automation. – 2015. – T. 20, №2. – C. 107-126.
226. Sun H. Drug efflux transporters in the CNS [Text] / H. Sun, H. Dai, N. Shaik [et al.] // Advanced drug delivery reviews. – 2003. – T. 55, №1. – C. 83-105.
227. Sweeney M.D. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders [Text] / M.D. Sweeney, A.P. Sagare, B.V. Zlokovic // Nature reviews neurology. – 2018. – T. 14, №3. – C. 133.
228. Sweeney M.D. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back [Text] / M.D. Sweeney, Z. Zhao, A. Montagne [et al.] // Physiological reviews. – 2019. – T. 99, №1. – C. 21-78.
229. Sweeney M.D. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways [Text] / M.D. Sweeney, S. Ayyadurai, B.V. Zlokovic // Nature neuroscience. – 2016. – T. 19, №6. – C. 771-783.
230. Tajés M. The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it [Text] / M. Tajés, E. Ramos-Fernández, X. Weng-Jiang [et al.] // Molecular membrane biology. – 2014. – T. 31, №5. – C. 152-167.

231. Tang F. Drug-resistant epilepsy: multiple hypotheses, few answers [Text] / F. Tang, A. Hartz, B. Bauer // *Frontiers in neurology*. – 2017. – T. 8. – C. 301.
232. Tietz S. Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions [Text] / S. Tietz, B. Engelhardt // *Journal of cell biology*. – 2015. – T. 209, №4. – C. 493-506.
233. Tornavaca O. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell–cell tension, angiogenesis, and barrier formation [et al.] / O. Tornavaca, M. Chia, N. Dufton [et al.] // *Journal of cell biology*. – 2015. – T. 208, №6. – C. 821-838.
234. Van Kalken C. Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus [Text] / C. van-Kalken, G. Giaccone, P. van der Valk [et al.] // *The American journal of pathology*. – 1992. – T. 141, №5. – C. 1063.
235. Van Veen H.W. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism [Text] / H.W. van Veen, A. Margolles, M. Müller [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2000. – T. 19, №11. – C. 2503-2514.
236. Victor P. Pharmacological activation of Nrf2 promotes wound healing [Text] / P. Victor, D. Sarada, K.M. Ramkumar // *European journal of pharmacology*. – 2020. – C. 173395.
237. Vlaming M.L.H., Lagas J.S., Schinkel A.H. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice [Text] / M.L.H. Vlaming, J.S. Lagas, A.H. Schinkel // *Advanced drug delivery reviews*. – 2009. – T. 61, №1. – C. 14-25.
238. Volk H.A. Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures [Text] / H.A. Volk, K. Burkhardt, H. Potshcka [et al.] // *Neuroscience*. – 2004. – T. 123, №3. – C. 751-759.
239. Wang J. Tautomeric equilibria of hydroxypyridines in different solvents: an ab initio study [Text] / J. Wang, R.J. Boyd // *The Journal of physical chemistry*. – 1996. – T. 100, №40. – C. 16141-16146.

240. Wild A.C. Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2 [Text] / A.C. Wild, H.R. Moinova, R.T. Mulcahy // Journal of biological chemistry. – 1999. – T. 274, №47. – C. 33627-33636.
241. Yamamoto H. Integrin β 1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability [Text] / H. Yamamoto, M. Ehling, K. Kato [et al.] // Nature communications. – 2015. – T. 6, №. 1. – C. 1-14.
242. Yang T. Ischemic preconditioning provides long-lasting neuroprotection against ischemic stroke: The role of Nrf2 [Text] / T. Yang, Y. Sun, Q. Li [et al.] // Experimental neurology. – 2020. – T. 325. – C. 113142.
243. Yu R. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism [Text] / R. Yu, C. Chen, Y. Mo [et al.] // Journal of biological chemistry. – 2000. – T. 275, №51. – C. 39907-39913.
244. Zipper L.M. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells [Text] / L.M. Zipper, R. T. Mulcahy // Toxicological sciences. – 2003. – T. 73, №1. – C. 124-134.
245. Zipper L.M. Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes [Text] / L.M. Zipper, R.T. Mulcahy // Biochemical and biophysical research communications. – 2000. – T. 278, №. 2. – C. 484-492.
246. Zlokovic B.V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders [Text] / B.V. Zlokovic // Neuron. – 2008. – T. 57, №2. – C. 178-201.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность:

Научному руководителю: заведующей кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, доктору медицинских наук, профессору Якушевой Елене Николаевне — за поддержку и помощь в выполнении диссертационной работы;

Заведующему патологоанатомическим отделением ГУЗ «Рязанский областной клинический онкологический диспансер», кандидату медицинских наук Виноградову Игорю Юрьевичу — за помощь в выполнении и анализе иммуногистохимических исследований;

Всем сотрудникам кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, оказывавшим поддержку и помощь в выполнении данной работы.