ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ ИМЕНИ В.В. ЗАКУСОВА»

На правах рукописи

ЛИТВИНОВА СВЕТЛАНА АЛЕКСАНДРОВНА

РАЗРАБОТКА ОРИГИНАЛЬНЫХ ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ, СОЧЕТАЮЩИХ ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ СВОЙСТВА С НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫМ, ПРОКОГНИТИВНЫМ И АНКСИОЛИТИЧЕСКИМ ЭФФЕКТАМИ

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

заслуженный деятель науки

Воронина Татьяна Александровна

Москва 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ... 6

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ... 18

1.1 Эпидемиология эпилепсии ... 18

1.2 Этиология эпилепсии ... 20

1.3 Патогенетические механизмы развития эпилепсии ... 22

1.4 Противоэпилептические препараты (ПЭП) ... 39

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ... 46

2.1 Экспериментальные животные ... 46

2.2 Используемые вещества ... 46

2.3 Методы, исследования противосудорожной активности ... 48

2.3.1 Тест максимального электрошока (МЭШ) ... 48

2.3.2 Тест электрошока с током малой силы ... 48

2.3.3 Судороги, вызванные коразолом при его подкожном введении ... 49

2.3.4 Тест пилокарпиновых судорог у мышей ... 49

2.4 Электрофизиологические (ЭЭГ) исследования судорожной активности ... 49

2.5 Модели хронической эпилепсии ... 50

2.5.1 Модель фокальной хронической кобальт-индуцированной эпилепсии ... 50

2.5.2 Модель генетической аудиогенной эпилепсии ... 52

2.5.3 Тест антагонизма с пилокарпином у крыс ... 52

2.5.4 Тест антагонизма с пилокарпином с предварительным введением раствора хлорида лития у крыс (модель рефрактерной эпилепсии) ... 53

2.5.5 Модель эпилептического статуса ... 53

2.5.6 Модель первично-генерализованной эпилептической активности, вызванной бемегридом ... 55

2.6 Методики оценки неврологического дефицита и острой токсичности ... 55

2.7 Модели церебральных повреждений ... 56

2.7.1 Модель глобальной ишемии ... 56

2.7.2 Моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы, геморрагического инсульта ... 60

2.8 Методики изучения противогипоксической активности ... 61

2.8.1 Тест нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме ... 61

2.8.2 Тест гемической гипоксии ... 61

2.9 Методы оценки нейропсихотропной активности ... 61

2.9.1 Тест приподнятого крестообразного лабиринта ... 61

2.9.2 Тест спонтанного чередования в Y-образном лабиринте 62
2.9.3 Тест водного лабиринта Морриса 63
2.9.4 Тест «Вынужденное плавание по Порсолту» 64
2.10 Нейрохимические методы исследования 65
2.10.1. Метод радиорецепторного связывания с ГАМКА-, ГАМКВ-, NMDA-, mGluII- и D2 - рецепторами мозга 65
2.10.2 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией (ВЭЖХ/ЭД) 69
2.10.3 Изучение активности ERK 1/2 киназ и синапсина I 70
2.10.4 Гистологический метод исследования 72
2.11 Статистическая обработка результатов 72
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 74
Глава 3 Изучение спектра противосудорожных эффектов производных оксимов бензоилпиридина, дибензофуранона и производных фенилпирролидона в острых тестах судорог (МЭШ и коразол) и их возможных побочных эффектов в тестах острой токсичности с оценкой преимуществ перед противоэпилептическими препаратами первой линии 74
3.1 Изучение противосудорожных эффектов производных оксимов бензоилпиридина в тестах максимального электрошока (МЭШ) и антагонизма с коразолом 74
3.1.1 Исследование противосудорожной активности производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина в тесте МЭШ 74
3.1.2 Исследование противосудорожной активности производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина в тесте антагонизма с коразолом 80
3.2 Изучение противосудорожных эффектов производных оксимов дибензофуранона в тестах МЭШ и антагонизма с коразолом 81
3.2.1 Исследование противосудорожной активности производных оксима дибензофуранона в тесте антагонизма с МЭШ 81
3.2.2 Исследование противосудорожной активности производных оксима дибензофуранона в тесте антагонизма с коразолом 84
3.3 Изучение противосудорожных эффектов производных 4-фенилпирролидона в тестах МЭШ и антагонизма с коразола 86
3.3.1 Исследование противосудорожной активности производных 4-фенилпирролидона в тесте судорог, вызванных МЭШ 86
3.3.2 Исследование противосудорожной активности производных 4-фенилпирролидона в тесте судорог, вызванных коразолом 88
3.4. Изучение возможных побочных эффектов и острой токсичности лидерных соединений оксимов бензоилпиридина, дибензофурана и производных 4-фенилпирролидона 89

3.4.1 Изучение возможных побочных эффектов и острой токсичности лидерных соединений оксимов бензоилпиридина 89

3.4.2 Изучение возможных побочных эффектов и острой токсичности лидерных соединений производных оксима дибензофуранона 93

3.4.3 Изучение возможных побочных эффектов и острой токсичности производного 4-фенилпирролидона, соединения ГИЖ-290 95

Глава 4 Изучение эффектов соединения-лидера из ряда оксимов бензоилпиридина (ГИЖ-298) на ЭпА мозга крыс на разных этапах формирования Эпи системы, в том числе развернутого эпилептического статуса и изучение особенностей спектра его противоэпилептических и нейропсихотропных эффектов в сравнении с вальпроевой кислотой 99

4.1 Исследование противосудорожной активности ГИЖ-298 в модели хронической фокальной (парциальной) эпилепсии, индуцированной кобальтом в сравнении с вальпроевой кислотой 99

4.2 Влияние соединения ГИЖ-298 в сравнении с вальпроевой кислотой на модели эпилептического статуса, вызванного нейротоксином гомоцистеина тиолоктоном 105

4.3 Изучение противосудорожного действия соединения ГИЖ-298, вальпроевой кислоты на модели аудиогенных судорог у крыс Крушинского-Молодкиной 111

4.4 Нейропсихотропные эффекты соединения ГИЖ-298 111

Глава 5 Изучение эффектов соединения-лидера из ряда 4-фенилпирролидона (ГИЖ-290) на ЭпА мозга на разных этапах формирования Эпи системы и изучение особенностей спектра его противоэпилептических и нейропсихотропных эффектов в сравнении с леветирацетамом. 117

5.1 Исследование влияния ГИЖ-290 в условиях модели хронической фокальной (парциальной) эпилепсии, индуцированной кобальтом 117

5.2 Изучение противосудорожного действия соединения ГИЖ-290 и леветирацетама на модели генерализованной эпилептической активности, вызванной бемегридом 123

5.3 Изучение противосудорожных эффектов соединения ГИЖ-290 в сравнении с леветирацетамом и фенотропилом на модели пилокарпиновых судорог 128

5.4 Изучение спектра нейропсихотропной активности ГИЖ-290 в сравнении с леветирацетамом 130

Глава 6 Расширенное изучение противосудорожных и нейропсихотропных эффектов соединений-лидеров из ряда оксимов дибензофуранона (ГИЖ-272 и ГИЖ-332) 136

6.1 Влияние соединений ГИЖ-332 и ГИЖ-272 на развитие эпилептической системы в модели кобальт-индуцированной хронической фокальной (парциальной) эпилепсии в сравнение с леветирацетамом 136

6.2 Исследование влияния ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на судороги крыс линии Крушинского-Молодкиной с генетически детерминированной аудиогенной эпилепсией 145

6.3 Изучение противогипоксических эффектов ГИЖ-332 и ГИЖ-272 на острых моделях гипоксии у мышей 146

Глава 7 Исследование нейропротекторного, противоишемического действия лидерных соединений из ряда оксимов дибензофуранона - ГИЖ-272 и ГИЖ-332 в моделях церебральных поражений - глобальной ишемии и посттравматической гематомы мозга крыс 150

7.1 Изучение противоишемических свойств ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на модели глобальной ишемии мозга 150

7.2 Исследование влияния соединения ГИЖ-272 на мозговой кровоток в условиях глобальной преходящей ишемии 156

7.3 Изучение влияния соединения ГИЖ-272 на выживаемость нейронов у крыс с глобальной ишемией мозга в гистологическом исследовании 158

7.4 Изучение эффектов ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на модели интрацеребральной посттравматической гематомы 162

Глава 8 Особенности пароксизмальной активности и спектральной мощности ЭЭГ после глобальной ишемии мозга и изучение эффектов соединения ГИЖ-272 и леветирацетама. 169

8.1 Исследование пароксизмальной активности ЭЭГ мозга крыс на разных сроках постишемического периода и влияние ГИЖ-272 и леветирацетама на эти изменения 169

8.2 Изучение влияния ГИЖ-272 и леветирацетама на изменения спектра мощности ЭЭГ.. 175

Глава 9 Исследование компонентов механизма реализации противосудорожной активности соединений лидеров ГИЖ- 298, ГИЖ-272, ГИЖ-332 и ГИЖ-290 185

9.1 Исследование нейрорецептороного механизма противосудорожного действия ГИЖ-298 185

9.2 Исследование влияния ГИЖ-298 на активность ERK1/2 киназ и синапсина I у мышей в тесте судорог, вызванных МЭШ 190

9.3 Исследование нейрохимического механизма противосудорожного действия соединения ГИЖ-298 в сравнении с топираматом в условиях модели судорог МЭШ 195

9.4 Изучение влияния ГИЖ-298 на баланс возбуждающих/тормозных аминокислот в структурах мозга мышей в модели судорог, вызванных МЭШ 201

9.5 Изучение нейрорецепторного и нейрохимического механизмов действия соединения ГИЖ-290 в сравнении с леветирацетамом в условиях литий-пилокарпиновых судорог 205

9.6 Изучение нейрохимических механизмов противосудорожного действия соединения ГИЖ-332 на модели судорог, вызванных МЭШ 212

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 217

ВЫВОДЫ 232

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 234

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 235

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 237

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний нервной системы и по данным противоэпилептической лиги около 65 - 67 млн. больных в мире страдает этой болезнью [38, 204, 364]. В Российской Федерации распространенность эпилепсии среди взрослого населения превышает 3 случая на 1000 обследованных [27, 28, 77]. 2/3 больных эпилепсией дебютируют в детском возрасте, и болеют всю жизнь и по оценке разных авторов в России инвалидами становятся от 20 до 50% больных [1, 25].

Эпилепсия, независимо от этиологии (наследственная или приобретенная) часто сопровождается когнитивными и психическими расстройствами [241]. Развитие коморбидных психических и когнитивных нарушений у больных эпилепсией зависит от многих причин, в том числе от формы эпилепсии, локализации эпилептического очага, частоты приступов, дебюта заболевания **[**14, 25, 35, 36, 39, 94, 101], используемого противосудорожного препарата (ПЭП) и продолжительности его применения **[**95, 216]. Когнитивные расстройства с нарушением интеллектуально-мнестических функций встречаются у 30–40% с эпилепсией [35, 38, 40, 72, 148]. Среди психических нарушений у больных эпилепсией наиболее часто встречаются депрессия (30-55%) и тревожные состояния (10-25%). У многих больных депрессия вызывается длительным приемом ПЭП. Эпилептические приступы сопровождаются нарушением ионного обмена, дефицитом АТФ и дисбалансом нейротрансмиттерных и транскрипционных путей, что приводит к эпилептизации мозга и появлению новых детерминантных и доминантных очагов эпилептической активности [115, 123, 301, 350].

Одним из ключевых факторов увеличения доли больных эпилепсией среди впервые диагностированных пациентов старше 50 лет являются сосудистые заболевания и травмы мозга [192; 22]. Каждый год за счет постинсультных и посттравматических осложнений число больных эпилепсией увеличивается на 4 млн [364]. При этом высокая доля развития судорожных приступов после перенесенного инсульта выявляется у детей [131]. С другой стороны, эпилепсия является фактором риска развития повторного нарушения мозгового кровообращения [104, 131, 301].

Для лечения эпилепсии применяется более 30 ПЭП, среди которых препаратами первой линии являются производные вальпроевой кислоты, карбамазепин, леветирацетам, габапентин, топирамат, ламотриджин, лакосамид. Однако многие из ПЭП обладают серьезными побочными эффектами, в том числе эмбриотоксическим и канцерогенным потенциалом (клобазам, ламотриджин, фенитоин, топирамат и др.). По международным оценкам контроль над приступами возможен только у 61–71% пациентов с эпилепсией [65], в то время как в РФ

только у 20-40% пациентов [29]. Многие из применяемых ПЭП (бромиды, бензодиазепиновые производные, барбитураты, топирамат, прегабалин, вальпроаты) вызывают когнитивные нарушения [307, 348, 349]. Доказанный депрессогенный эффект имеют фенобарбитал, топирамат, вигабатрин, тиагабин и леветирацетам.

Необходимость создания ПЭП с нейропротективной активностью продиктована сходством патогенеза эпилепсии и ишемии, в частности, участием в патогенезе оксидантного стресса, глутаматной нейротоксичности, внутриклеточного накопления кальция, увеличением провоспалительных цитокинов. Инсульт вызывает изменения пластичности аксонов и дендритов и перестройку нейрональных связей, что в результате, может стойко модифицировать образование и распространение биоритмов мозга в течение нескольких недель после инсульта [115, 123, 301], и привести к формированию эпилептической системы или ее трансформации в более рефрактерную [350]. В связи с вышеизложенным, возникает необходимость создания ПЭП нового поколения, лишенных побочных эффектов известных ПЭП и сочетающих противосудорожную, нейропротективную, антидепрессивную, аксиолитическую иноотропную активности, что позволит не только устранять симптоматические судорожные проявления, но и остановить прогрессирование заболевания и ослабить коморбидные нарушения.

Степень разработанности темы исследования

В России до настоящего времени отсутствуют отечественные оригинальные ПЭП и все основные препараты закупаются за рубежом.

Ранее в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова были синтезированы соединения с противосудорожной активностью и обладающие антидепрессивными и анксиолитическими свойствами среди производных пиридилфенил-метанонов [23]. В продолжение этих исследований в отделе химии лекарственных средств НИИ фармакологии имени В.В. Закусова Л.А. Жмуренко и Г.В. Мокровым (руководитель член-корр. – Т.А. Гудашева) были синтезированы с целью поиска веществ обладающих противосудорожной активностью гетероциклические соединения: производные оксимов бензоилпиридина, дибензофурана(-нона) и производные 4-фенилпирролидона. Производные 4-фенилпирролидона являются новыми структурными аналогами известного ПЭП леветирацетама, используемого в клинике при лечении парциальных и генерализованных форм эпилепсии, и обладающего ноотропными свойствами. Поиски ПЭП в ряду пирролидонов продолжаются во всем мире, и в клиническую практику внедрены такие ПЭП, как селетрацетам и бриварацетам. Производные бензофурана также широко изучаются в мире и обладают широким спектром фармакологических эффектов,

в том числе нейропротективным, цитопротекторным и антиоксидантным эффектами [231]. Оригинальные производные оксима дибензофуранона, в том числе с коричной кислотой, согласно исследованиям, проведенным нами по программе PASS, обладают потенциальной противоишемической и мембранопротекторной активностью (Pa=0.65-0.95).

В настоящей работе используемый метод электроэнцефалографии (ЭЭГ) является незаменимым методом в диагностике эпилепсии и ЭЭГ-коррелятов приступов. В лаборатории психофармакологии накоплен достаточный научный материал по выявлению структурных «мишеней» противосудорожной активности известных ПЭП, например, таких как бепродон и лакосамид и др. [7, 61].

Целью исследования явилась разработка препаратов нового поколения для лечения эпилепсии, сочетающих противосудорожное, нейропротективное и нейропсихотропное действие.

Задачи исследования

1. Изучить спектр противосудорожных эффектов производных оксимов бензоилпиридина, дибензофуранона и производных фенилпирролидона в базисных тестах оценки судорожных состояний, и исследовать побочные эффекты и острую токсичность соединений. Выявить соединения лидеры и их преимущества перед противоэпилептическими препаратами первой линии.

2. Изучить эффекты соединения-лидера из ряда оксимов бензоилпиридина (ГИЖ-298) на Эпи активность мозга на разных этапах формирования эпилептической системы и его влияние на эпилептический статус в ЭЭГ-исследованиях в сравнении с вальпроевой кислотой. Исследовать нейропсихотропные эффекты соединения ГИЖ-298.

3. Изучить эффекты соединения-лидера из ряда фенилпирролидона (ГИЖ-290) на Эпи активность мозга на разных этапах формирования эпилептической системы и выявить особенности спектра его противоэпилептических и нейропсихотропных эффектов в сравнении с леветирацетамом.

4. Изучить эффекты соединений-лидеров из ряда оксимов дибензофуранона (ГИЖ-272, ГИЖ-332) на Эпи активность мозга на разных этапах формирования эпилептической системы и изучить их нейропсихотропные эффекты.

5. Изучить эффекты производных оксимов дибензофуранона на моделях острой гипоксии, глобальной церебральной ишемии и посттравматической гематомы мозга крыс.

6. Исследовать динамику постишемической пароксизмальной активности и спектральных изменений ЭЭГ в структурах мозга крыс при ишемии на разных сроках постишемического состояния. Оценить влияние соединения-лидера ГИЖ-272 на пароксизмальную активность мозга и спектр мощности ЭЭГ крыс с ишемией мозга.

7. Изучить в ЭЭГ исследованиях механизм реализации противоэпилептической активности соединений лидеров ГИЖ-298, ГИЖ-290 и ГИЖ-272, ГИЖ-276 и ГИЖ-332 и выявить мишени (структуры мозга) действия этих веществ.

8. Изучить особенности нейротрансмиттерных, нейрорецепторных и транскрипционных (МАР-киназа) нарушений, возникающих при судорожных состояниях, и выявить компоненты нейрохимического механизма реализации эффектов лидерных соединений.

Научная новизна

Выявлены оригинальные соединения среди производных фенилпирролидона, оксимов бензоилпиридина и дибензофуранона, сочетающие высокую противосудорожную активность с нейропротективными и нейропсихотропными свойствами и имеющие преимущества перед известными ПЭП первой линии.

Среди производных бензоилпиридина выявлено соединение-лидер ГИЖ-298 (диалкиламино-этиловый эфир оксима 4-бензоилпиридина), обладающий способностью в широком диапазоне доз устранять тонико-клонические судорожные реакции, вызванные максимальным электрошоком (МЭШ), и препятствовать развитию тонической экстензии у крыс с генетически детерминированной эпилепсией (линия крыс Крушинского-Молодкиной). Выявлены особенности противосудорожного действия ГИЖ-298 в хронической фокальной модели эпилепсии. Установлено, что ГИЖ-298 уменьшает число и длительность судорожных разрядов во всех структурах мозга как на 1, так и на 2 стадии формирования Эпи системы. По активности, выраженности эффекта и быстроте его наступления ГИЖ-298 превосходит вальпроевую кислоту. Выявлена способность ГИЖ-298 (40 и 60 мг/кг) с преимуществом перед вальпроевой кислотой (150 мг/кг) устранять моторные и ЭЭГ-проявления развернутого эпилептического статуса, вызванного нейротоксином гомоцистеином тиолактона, и защищать от гибели 100% крыс. Выявлены анксиолитические свойства ГИЖ-298 и отсутствие седативных реакций, характерных для вальпроевой кислоты. Установлено, что структурными мишенями противосудорожного действия для ГИЖ-298 является контрлатеральная кора, гиппокамп и гипоталамус.

Среди производных 4-фенилпирролидона выявлено соединение-лидер ГИЖ-290 (2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты) и установлены его

преимущества перед леветирацетамом. Показано, что ГИЖ-290 оказывает противосудорожный эффект в тестах антагонизма с пилокарпином, литий-пилокарпином, коразолом и максимальным электрошоком в диапазоне доз 2,5–10 мг/кг, а леветирацетам (600 мг/кг) эффективен только в тестах антагонизма с пилокарпином и литий-пилокарпином. Особенностью противосудорожного действия ГИЖ-290 в хронической фокальной модели эпилепсии является то, что соединение уменьшает число Эпи-разрядов и их длительность в гиппокампе у крыс с развитой Эпи системой (на 2 стадии), как и препарат сравнения леветирацетам. Установлены ноотропные свойства ГИЖ-290: соединение ускоряет обучение животных и облегчает воспроизведение памятного следа. Установлено, что структурной мишенью противосудорожного действия для ГИЖ-290 является гиппокамп.

В ряду производных дибензофуранона выявлены соединения-лидеры ГИЖ-332 (О-(2-хлорбензоил) оксим 3,4,6,7,8,9-гексагидродибензо[b,d]фуран-1(2Н)-она) и ГИЖ-272 (О-(4-циннамоил) оксим 3,4,6,7,8,9-гексагидродибензо[b,d]фуран-1(2Н)-она). Показано, что ГИЖ-332 (5 - 20 мг/кг) оказывает противосудорожный эффект в тестах антагонизма с МЭШ, а на фокальной кобальтовой хронической модели эпилепсии устраняет ЭпА в корковых структурах мозга крыс преимущественно на 2 стадии развития Эпи системы. Установлено, что ГИЖ-272 сочетает противосудорожные и нейропротективные свойства. На моделях глобальной ишемии и посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) ГИЖ-272 (10 мг/кг, курс 7 дней) увеличивает количество выживших крыс с церебральной патологией (на 33-35%), ослабляет неврологические и моторные нарушения и восстанавливает когнитивные функции. Показано, что ГИЖ-272 увеличивает в несколько раз количество выживших нейронов коры больших полушарий и гиппокампа (в поле СА3 и зубчатой извилине) и устраняет дезорганизацию нейрональных слоев коры. На модели фокальной кобальт-индуцированной эпилепсии ГИЖ-272 оказывает ингибирующее влияние на ЭпА преимущественно на 1 стадии развития Эпи системы. Установлено, что структурными мишенями действия для ГИЖ-272 является гипоталамус и гиппокамп, а для ГИЖ-332 - кора больших полушарий.

Выявлены особенности развития пароксизмальной активности и спектральные изменения в постишемический период на модели глобальной ишемии мозга крыс. Установлено появление доминантных очагов ЭпА в зависимости от времени постинсультного периода: на ранних сроках ишемии лидирующей структурой является кора, а на поздних – гипоталамус. Охарактеризованы спектральные нарушения биоритмов мозга в динамике ишемического инсульта и выявлена взаимосвязь между дельта-активностью и выживанием.

Установлено, что мишени действия соединения ГИЖ-272 на модели ишемии совпадают с мишенями, выявленными на модели хронической очаговой эпилепсии. Показано, что ГИЖ-272 устраняет раннюю постишемическую пароксизмальную активность на протяжении 7 суток

ишемии во всех исследуемых структурах мозга с наибольшей выраженностью эффекта в гипоталамусе и гиппокампе, и не влияет на появление ее в отставленный период ишемии (28 сутки).

Методом радиолигандного анализа ex vivo определена вовлеченность ГАМКВ-рецепторов в механизм противосудорожного действия ГИЖ-290, ГАМКА-рецепторов в противосудорожный эффект леветирацетама и D2-рецепторов в противосудорожный эффект ГИЖ-298.

Установлена эпилептогенная роль чрезмерной функциональной активности сигнального MAP-зависимого киназного пути (ERK1/2 киназы) в стриатуме и снижение плотности D2 рецепторов в той же структуре в реализации судорог, вызванных МЭШ. Установлены компоненты механизма реализации противосудорожного действия ГИЖ-298 основанные на способности снижать чрезмерно-активированную функциональную активность дофаминергической системы и активность ERK1/2 киназ, увеличивать плотность D2-рецепторов в стриатуме и увеличивать уровни тормозных аминокислот (ГАМК, таурин, глицин) в гипоталамусе.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты обосновывают целесообразность дальнейшего расширенного преклинического изучения ГИЖ-290, ГИЖ-298 и ГИЖ-272 в качестве потенциальных средств лечения эпилепсии и пароксизмальных состояний.

Установленные особенности спектра противосудорожной активности лидерных соединений позволяет рекомендовать ГИЖ-298 в качестве средства лечения очаговой (фокальной) эпилепсии, эпилептического статуса, в том числе рефрактерного. ГИЖ-290 - в качестве средства лечения парциальных судорог, ювенильной миоклонической эпилепсии с нарушением когнитивных функций. ГИЖ-272 - для лечения постинсультной эпилепсии, посттравматической эпилепсии, постинсультных и постсудорожных когнитивных нарушений. ГИЖ-272 сочетает противосудорожные и нейропротективные свойства и поэтому может быть использован не только для устранения судорожной симптоматики, но и для замедления прогрессирования заболевания

Определение структурных мишеней мозга, на которые оказывают действие известные ПЭП и новые соединения позволяет прогнозировать эффективность препаратов и индивидуально подойти к лечению больных в зависимости от выявленного у них детерминантного очага Эпи активности.

Разработанная методология фармакологического скрининга для поиска соединений, сочетающих высокую противосудорожную активность с ноотропным,

противогипоксическим, нейропротективным и психотропными эффектами может быть использована при поиске новых препаратов.

Методология и методы исследования

При планировании экспериментальных исследований использовались методические рекомендации, изложенные в руководстве по доклиническому изучению лекарственных средств под общей редакцией А.Н. Миронова (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. Главы 14, 16, 17, 24, 28. М.: Гриф и К. — 2012).

Скрининг противосудорожных эффектов новых соединений проводили на беспородных мышах-самцах с использованием тестов антагонизма с максимальным электрошоком и пентилентетразолом. Выявление соединений лидеров осуществляли по выраженности противосудорожных эффектов, острой токсичности и терапевтической широте. Особенности противосудорожного спектра лидерных соединений изучали на моделях хронической эпилепсии, эпилептического статуса и в модели генетически детерминированной эпилепсии. Эксперименты проводили на беспородных крысах-самцах с оценкой ЭЭГ изменений пароксизмальной активности в таких структурах мозга, как правая и левая кора (сенсомоторная зона), гипоталамус и гиппокамп. С помощью нейротоксина гомоцистеина тиолактона вызывали развитие непрекращающегося эпилептического статуса у крыс с кобальт-индуцированным эпилептическим очагом с развитой и стабильной эпилептической системой. Пилокарпиновую модель эпилепсии создавали с использованием беспородных мышей-самцов, а литий-пилокарпиновую модель эпилепсии - на крысах самцах линии Вистар. В качестве тест-системы генетически детерминированной аудиогенной эпилепсии использовали половозрелых крыс-самцов инбредной линии Крушинского-Молодкиной со 100% признаком эпилептиформной активности. Регистрацию биопотенциалов мозга осуществляли на 21-канальном аппаратно-программном комплексе для топографического картирования электрической активности мозга, нейрографе «Нейросенсор-Нейро-КМ» (СТАТОКИН, Россия) с использованием программы BRAINSYS для анализа пароксизмальной активности.

В исследовании компонентов механизма действия лидерных соединений использовали стандартные молекулярно-биологические методы: вестерн-блот анализ, нейрорецепторный (радиолигандный метод) и нейромедиаторный (ВЭЖХ/ЭД) анализ в структурах мозга крыс и мышей. Оценку активности ERK1/2 киназ и синапсина I с помощью вестерн-блот анализа проводили как в культуре клеток, так и в стриатуме мышей.

Для разработки средств лечения постинсультной эпилепсии создавали модели церебральных нарушений по ишемическому (билатеральная перевязка сонных артерий) и геморрагическому типу (посттравматическая гематома). Для установления

противоишемического и нейропротективного эффектов лидерных соединений из ряда оксимов дибензофурана оценивали показатели выживаемости и морфогистологического контроля, и, с помощью стандартных поведенческих методик, выраженность неврологического, когнитивного и моторного дефицитов. На отрезках ЭЭГ записей оценивали появление постишемических пароксизмальных и спектральных изменений. Оценку возможных нейропсихотропных эффектов соединений проводили в батарее поведенческих тестов по выявлению анксиолитической (приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ)), антидепрессивной (вынужденное плавание по Порсолту) и ноотропной (Y-лабиринт, лабиринт Морриса) активностей у беспородных мышей-самцов. Методология исследования представлена на рисунке 1.

Рисунок 1 - Дизайн исследования

Положения, выносимые на защиту

1. Выявлены оригинальные соединения, обладающие противосудорожной активностью в рядах оксимов 3- и 4-бензоилпиридина (ГИЖ-301, ГИЖ-292, ГИЖ-311, ГИЖ-277, ГИЖ-298, ГИЖ-162, ГИЖ-323), дибензофурана(-нона) (ГИЖ-272, ГИЖ-276, ГИЖ-328, ГИЖ-338, ГИЖ-332, ГИЖ-327, ГИЖ-310, ГИЖ-310А и ГИЖ-333) и производных 4-фенилпирролидона

(ГИЖ-286, ГИЖ-290, ГИЖ-295, ГИЖ-296, ГИЖ-305) и установлены особенности спектров противоэпилептической активности и преимущества перед известными ПЭП.

2. Среди производных оксима 4-бензоилпиридина соединение-лидер ГИЖ-298 устраняет ЭпА на различных ЭЭГ и моторных моделях очаговой и генерализованной эпилепсии, в том числе генетически детерминированной эпилепсии, обладает уникальной способностью полностью устранять проявления эпилептического статуса, и превосходит по активности и эффективности вальпроевую кислоту. Установлены анксиолитические свойства ГИЖ-298.

3. Среди производных 4-фенилпирролидона соединение-лидер ГИЖ-290 (2-10 мг/кг) обладает противоэпилептической активностью на очаговой хронической, пилокарпиновой и литий-пилокарпиновой моделях эпилепсии, и превосходит по активности препарат сравнения леветирацетам (600 мг/кг). По ноотропному действию ГИЖ-290 превосходит по активности и эффективности леветирацетам.

4. Соединение-лидер ГИЖ-272 (оксим дибензофуранона) сочетает нейропротективные и противоишемические свойства, установленные на моделях ишемического инсульта и посттравматической гематомы, и противоэпилептические свойства, установленные на моделях очаговой хронической эпилепсии и генетически детерминированной эпилепсии.

5. Установлены ЭЭГ маркеры нейрональной дисфункции при ишемии мозга и выявлены различия в ЭЭГ спектре дельта - и тета активности в постинсультной динамике: ранняя пароксизмальная активность появляется на 2-7 сутки ишемии, при этом лидирующей структурой по числу пароксизмальных разрядов является кора, а поздняя - с 28-х суток ишемии с доминантным очагом пароксизмальной активности в гипоталамусе; спектральные изменения дельта и тета-активности отражают тяжесть инсульта.

6. Соединение ГИЖ-272 устраняет раннюю постишемическую пароксизмальную активность во всех исследуемых структурах мозга с наибольшей выраженностью эффекта в гипоталамусе и гиппокампе и восстанавливает спектральные характеристики ЭЭГ крыс после ишемии и значительно превосходит леветирацетам.

7. ГИЖ-272 сочетает противосудорожные, нейропротективные, противоишемические и противогипоксические свойства и в связи с этим может быть использован не только для устранения судорожной симптоматики, но и для замедления прогрессирования эпилепсии, и в лечении постинсультной эпилепсии.

8. Структурными мишенями действия для ГИЖ-290 и леветирацетама является гиппокамп, для ГИЖ-272 - гиппокамп и гипоталамус (что совпадает с ЭЭГ мишенями, выявленными на модели глобальной ишемии), для ГИЖ-298 – корковые структуры,

гипоталамус и гиппокамп, а для вальпроевой кислоты – ипсилатеральная кора и гипоталамус.

9. Установлены функциональные рецепторные мишени в условиях судорог: для ГИЖ-290 - ГАМКВ-рецепторы, а для ГИЖ-298 – D2 рецепторы.

10. Установлены компоненты нейрохимического механизма противосудорожного действия ГИЖ-298, а именно восстановление нарушений функциональной активности дофаминергической системы, ERK1/2 киназ в стриатуме и тормозных аминокислот в гипоталамусе, вызванных судорогами.

Степень достоверности полученных результатов

Исследование выполнено на большом экспериментальном материале с использованием адекватных методов исследования. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием современных методов математической статистики.

Апробация результатов

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: Научно-практическая конференция (Санкт-Петербург, 2016); Международный форум эпилептологов стран СНГ/ЕврАзЭС «Эпилепсия и пароксизмальные состояния» (Сочи, 2015, 2016, 2017; Ростов-на-Дону, 2018; Сочи, 2019; Москва, 2020); Сеченовский Международный Биомедицинский Саммит (Москва, 2017); V съезд фармакологов России (Ярославль); 5th Annual Conference on Stroke and Neurological Disorders (Турция, 2018); 4-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием (Москва, 2019); VIII межрегиональная научно-практическая конференция (Москва, 2019); VII международный молодежный медицинский конгресс (Санкт-Петербург, 2019); World Brain Congress (Китай, 2019); 45th FEBS Congress (Словения, 2021); II Научная конференция молодых ученых с международным участием (Москва, 2021); VIII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием (Нижний Новгород, 2022); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Эпилепсия и пароксизмальные состояния как междисциплинарная проблема» (Москва, 2022).

Внедрение результатов исследования в практику

Выявлены новые высокоэффективные соединения в трех рядах химических соединений - производных 4-фенилпирролидона, оксимов бензоилпиридина и дибензофуранона. Установлены их особенности спектров противосудорожного действия, психотропной

активности и структурные мишени воздействия, что позволит индивидуально подойти к лечению больных эпилепсией, отталкиваясь не только от особенности эпилептической системы пациента, но и от воздействия препарата на структуры мозга, генерирующие Эпи активность, а также на сопутствующие коморбидные заболевания. Среди производных оксима бензоилпиридина выявлено соединение ГИЖ-298, которое обладает противоэпилептической активностью на разных моделях эпилепсии, в том числе обладает уникальной способностью полностью устранять проявления эпилептического статуса и имеет преимущества перед бензодиазепинами и вальпроатами, а также обладает анксиолитическими свойствами (Патент РФ 2643091 С2). Среди производных оксима дибензофуранона выявлено соединение ГИЖ-272, оказывающее выраженное нейропротективное действие и противосудорожное действие (Патент РФ 2744758 С2): установлено корректирующее влияние ГИЖ-272 на ЭЭГ маркеры пароксизмальной активности и нейрональной дисфункции на модели глобальной ишемии. Среди производных 4-фенилпирролидона выявлено соединение ГИЖ-290, которое сочетает противоэпилептическую активность и способность улучшать когнитивные функции и превосходит по активности структурный аналог леветирацетам (Патент РФ 2748419 С2). Полученные данные являются основой для расширенного преклинического изучения оригинальных соединений ГИЖ-298, ГИЖ-290 и ГИЖ-272 с целью последующего внедрения в клиническую практику для лечения различных форм эпилепсии, в том числе эпилептического статуса, у пациентов после нарушения мозгового кровообращения и травм и у пациентов с когнитивными и психоэмоциональными нарушениями, что решает важную медицинскую проблему.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно разработаны дизайн, протоколы и схемы экспериментов, методология исследования. Основные научные результаты по теме исследования получены лично соискателем. Совместно с научным консультантом определены цели, задачи, объем исследования. Автор самостоятельно проводила исследования с использованием моделей по изучению противоэпилептиформной, нейропротективной, противоишемической, нейропсихотропной активностей. Лично разработан метод оценки соединений, используемых для лечения постинсульной эпилепсии. Личный вклад соискателя при выполнении экспериментальных исследований, подготовки публикаций в соавторстве составил от 70 до 100%.

Связь исследования с планами научно-исследовательских работ

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (регистрационные номера - АААА-А16-116042550082-6, АААА-А17-117042510371-2, АААА-А18-118021290130-8, АААА-А19-119021390084-2, 122020100281-9).

Сведения о публикациях по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 62 работы, в том числе 31 статья в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 27 статей в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, 10 статей в журналах, индексируемых РИНЦ, и 18 тезисов. Получены 3 патента на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 271 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 381 источников, из них отечественной – 83 и зарубежной – 298 источников, за последние 5 лет более 25%. Работа иллюстрирована 66 таблицами и 50 рисунками.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

По данным ВОЗ в настоящее время в мире страдают эпилепсией не менее 65 млн. человек [364]. Заболеваемость эпилепсией в разных странах в среднем составляет 67.77 на 100000 человек в год [160].

Эпилепсия является жизнеугрожающим заболеванием, может приводить к значительному снижению качества жизни и смерти. Эпилепсия часто сопровождается такими осложнениями, как травма, отек и ишемия мозга, кардиогенный шок, головные боли, различные когнитивные и интеллектуальные нарушения, психозы, галлюцинации, неврозы, депрессия и другие [1, 87, 105, 109, 338, 380].

В развитии эпилепсии принимает участие эпилептический нейрон, который отличается от других нейронов нарушением в структуре ионных каналов и рецепторов, что приводит к повышенной тенденции к деполяризации. Так же развитие очага связывают с нарушением регуляции концентрации внеклеточных ионов и трансмиттеров. Возникает дисбаланс между процессами возбуждения и торможения в центральной нервной системе (ЦНС). Формирование и постепенное расширение зоны патологического синхронного возбуждения нейронов на новые структуры мозга представляет собой основу эпилептогенеза, как хронического процесса, который ведет к развитию и усилению судорог [37]. Эпилепсия может развиваться как самостоятельное заболевание, так и являться следствием других патологий: нарушений развития головного мозга, ишемического инсульта, нейродегенеративных заболеваний, травм, инфекций и др. Одна из ролей в патогенезе некоторых форм эпилепсии принадлежит генетическим факторам. Известно более 1000 генов, отвечающих за различные процессы в ЦНС, мутации которых ассоциированы с развитием эпилепсии [292].

1.1 Эпидемиология эпилепсии

От 20 до 50 % больных эпилепсией в России со временем становятся инвалидами [25, 27, 40]. Если на начальной стадии заболевания социальная дезадаптация обусловлена пароксизмальными феноменами, то при прогрессировании заболевания все большую значимость приобретают психические и когнитивные нарушения [45], которые, в свою очередь, могут усугублять припадки и снижать вероятность ремиссии от приема противоэпилептических препаратов (ПЭП).

Среди психических нарушений наиболее часто встречаются депрессия 30-55% и тревожные состояния 10-25%. У больных депрессия вызывается длительным приемом ПЭП: доказанный депрессогенный эффект имеют фенобарбитал, топирамат, вигабатрин, тиагабин и

леветирацетам. ПЭП способны вызывать аггравацию приступов и их побочные эффекты способны трансформировать приступы [33].

Когнитивные расстройства с нарушением интеллектуально-мнестических функций встречаются у 30–40% детей и у взрослых с эпилепсией [35, 38, 40, 148] и зависят от нескольких факторов, основными из которых являются форма эпилепсии, локализация очага, частота приступов и дебют заболевания [14, 25, 35, 36, 39, 46, 101, 148, 264]. У детей эпилептические приступы, а также терапия ПЭП оказывают влияние на развитие структур центральной нервной системы и формирование высших психических функций и функций, составляющих основу когнитивной деятельности (внимание, гнозис, память, мышление). У детей встречаются особые состояния – эпилептические энцефалопатии, обусловленные продолженной эпилептической активностью на электроэнцефалограмме во время медленно-волнового сна [70]. У взрослых и особенно пожилых людей длительный анамнез заболевания, поражение структуры головного мозга и другие факторы могут приводить к интеллектуально-мнестическим нарушениям вплоть до деменции различной степени выраженности [34]. В развитии когнитивных нарушений имеет значение и прием ПЭП, среди которых с наиболее неблагоприятным профилем обладают бромиды, бензодиазепиновые производные, барбитураты [349]. Доказанными ухудшающими память свойствами обладают топирамат, прегабалин, вальпроаты [242, 307]. Одной из наиболее часто встречающихся когнитивных проблем у больных с эпилепсией является нарушение памяти [346], по данным других авторов - дефицит внимания [94, 107]. В настоящее время применяют комплексную терапию для улучшения памяти у больных с эпилепсией, которая включает ноотропные препараты, однако доказательная база эффективности таких средств не всегда имеется. Чаще прибегают к замене на ПЭП, не имеющих негативного влияния на память, таких как ламотриджин, габапентин, леветирацетам, лакосамид.

Одной из ведущих причин увеличения доли больных эпилепсией являются сосудистые заболевания, которые составляют более 50% прироста впервые диагностированных эпилепсий у пациентов старше 50 лет [22, 192]. Чувствительность мозга к судорогам усиливается в пред – или постинсультный период благодаря снижению мозгового кровотока, низкой скорости церебрального метаболизма кислорода и повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера [355]. Риск развития постинсультной эпилепсии увеличивается при корковом расположении очага, при тяжелых инсультах и при геморрагической трансформации ишемического инсульта [187, 299, 325]. Неспровоцированные поздние эпилептические приступы развиваются у 10-12% пациентов в ближайшие 5-10 лет после инсульта [143, 190, 312]. Самый высокий процент развития судорожных приступов после перенесенного инсульта

выявляется у детей и составляет 58% [131]. Инсульт вызывает изменения пластичности аксонов и дендритов и перестройку нейрональных связей, что в результате, может стойко модифицировать образование и распространение ритмов мозга в течение нескольких недель после инсульта [115, 123, 301] и привести к формированию эпилептической системы или трансформации ее в более рефрактерную [350]. Так, например, во время острой фазы ишемии после окклюзии средней мозговой артерии у крыс изменяется распределение мощности спектра ЭЭГ всех диапазонов частот (от 0-30 Гц), но основные изменения связаны с увеличением доли дельта (δ) колебаний и снижением тета (θ) ритмов [301]. Эпилептические приступы, в том числе постинсультные, сопровождаются структурными изменениями, дефицитом АТФ, нарушением ионного обмена и дисбалансом нейротрансмиттерных и транскрипционных путей, что приводит к эпилептизации мозга и появлению новых детерминантных и доминантных очагов эпилептической активности, которые со временем становятся самостоятельными [115, 123, 301, 350]. С другой стороны, эпилепсия может быть фактором риска развития повторного нарушения мозгового кровообращения [131, 301].

1.2 Этиология эпилепсии

Эпилепсия – гетерогенная группа синдромов, значительно отличающихся друг от друга, как по характеру клинических проявлений, так и по причинам возникновения. Эпилептический синдром – это характерный набор клинических и ЭЭГ-признаков, часто обусловленных специфическими факторами (структурными, генетическими, метаболическими, иммунными и инфекционными). Согласно последней классификации эпилепсий, принятой в 2017 г. International League Against Epilepsy (ILAE), характеристика эпилепсии складывается из трех диагностических уровней [322].

На первом уровне определяется тип приступа, на втором – тип эпилепсии (генерализованная, фокальная, сочетанная фокально-генерализованная), затем следует определение эпилептического синдрома, при этом на каждом уровне необходимо учитывать этиологию и сопутствующие состояния.

Главным проявлением эпилепсии являются приступы, которые по своему характеру делятся на атонические (потеря сознания с внезапной утратой тонуса мышц и таким же быстрым восстановлением), клонические (нерегулярные кратковременные спазмы, для которых характерна быстрая смена периодов сокращения и расслабления скелетной мускулатуры), тонические (мышечные сокращения, при которых конечности или все тело застывают в вынужденном положении, в т.ч. спазмы дыхательной мускулатуры) и миоклонические (внезапное непроизвольное сокращение различных мышечных групп). Существуют также

формы бессудорожных эпилептических припадков (абсансы) в виде кратковременной утраты сознания.

В зависимости от степени вовлечения структур головного мозга, выделяют фокальную и генерализованную формы эпилепсии. При фокальной эпилепсии (например, височной) происходит формирование локального эпилептического очага в одном из полушарий головного мозга, чаще всего в результате формирования очаговой патологии (инсульт, опухоль) или травмы. При генерализованной эпилепсии аномальное возбуждение широко распространяется в мозге, и такие судороги связаны с одновременной активацией многих областей обоих полушарий. В некоторых случаях (например, синдром Драве) могут регистрироваться как фокальные, так и генерализованные припадки [154], в этом случае говорят о комбинированном типе эпилепсии. В тех клинических случаях, когда данные ЭЭГ недоступны или малоинформативны, и однозначно классифицировать припадки как фокальные или генерализованные, невозможно, говорят о неутонченной эпилепсии [322].

Следующий уровень классификации заключается в установлении эпилептического синдрома как совокупности характеристик, включая тип эпилептического припадка, данные ЭЭГ и нейровизуализации, может отмечаться характерная коморбидность, например интеллектуальные и психиатрические нарушения. Существует несколько десятков хорошо описанных эпилептических синдромов (например, детская абсансная эпилепсия, синдром Веста, синдром Драве и др.). В некоторых случаях судорожный приступ при эпилепсии провоцируется действием четко идентифицируемых и объективно специфических триггеров, в качестве которых могут выступать как внешние раздражители (ритмичные вспышки света, визуальные, вестибулярные, слуховые или тактильные стимулы), так и внутренние стимулы (элементарные или высшие функции нервной деятельности, такие как определенные движения, эмоции или расчеты). В этом случае говорят о рефлекторной форме эпилепсии [281]. Рефлекторные эпилептические припадки могут быть фокальными или генерализованными, и в некоторых случаях могут происходить наряду со спонтанными судорогами.

Следующий этап базируется на установлении этиологии заболевания. Согласно новой классификации, все эпилепсии делятся на структурные, генетические, инфекционные, метаболические, иммунные и с неизвестной этиологией. При структурных эпилепсиях обнаруживается выраженный дефект головного мозга, являющийся причиной эпилепсии (порок развития головного мозга, последствия травмы, инсульта). Таким образом, структурные эпилепсии могут быть как генетическими, в тех случаях, когда мутации приводят к серьезным нарушениям развития ЦНС, так и приобретенными. Генетические эпилепсии вызываются рядом мутаций, не приводящих к значительным нарушениям развития и морфологии тканей нервной системы, и вызывают нарушения преимущественно на уровне механизмов передачи

нервного импульса (например, мутации по генам ионных каналов). В некоторых случаях (в особенности при сложном типе наследования, который подразумевает изменения во многих генах) для развития генетических эпилепсий необходимо сочетание определенного набора мутаций и факторов внешней среды. Метаболические эпилепсии являются прямым результатом известного или предполагаемого метаболического нарушения, при этом эпилепсия доминирует в клинической картине. Часто это хорошо известные наследственные метаболические заболевания, такие как порфирия, нарушения обмена аминокислот, нарушения креатиновой системы и пиридоксинзависимые судороги. Таким образом, метаболическая эпилепсия в большинстве случаев также может определяться генетическими факторами [250, 304]. Инфекционные эпилепсии развиваются вследствие перенесенных или хронических нейроинфекций, в т.ч. внутриутробных (нейроцистицеркоз, туберкулез, ВИЧ, вирусный энцефалит, токсоплазмоз, лихорадка Зика, COVID-19) [86, 128, 180, 278]. Наконец, иммунные (или аутоиммунные) эпилепсии развиваются как прямое следствие аутоиммунных процессов. Примером является энцефалит с обнаружением аутоантител к NMDA-рецепторам [172, 202]. В некоторых случаях можно говорить о сочетанной форме эпилепсии. Например, некоторые инфекционные агенты нередко индуцируют аутоиммунные процессы, которые приводят к структурному повреждению мозга с клиническими проявлениями в виде эпилепсии (таким образом, эпилепсия сочетает инфекционную, аутоиммунную и структурную этиологию). Такое наблюдается в ряде приобретенных случаев синдром Дайка-Давыдова-Массона, при эпилептическом синдроме, индуцированном фебрильной инфекцией (Febrile infection related epilepsy syndrome – FIRES), или так называемой разрушительной энцефалопатии детей школьного возраста (Devastating epileptic encephalopathy in school-aged children – DESC) [266, 332, 371]. Таким образом, новая концепция этиологической классификации эпилепсии является более гибкой, позволяя в сложных случаях выдвигать на первый план основную причину развития эпилепсии – чисто генетическую, генетическую в сочетании со структурными нарушениями, структурные нарушения в результате негенетических причин и др.

1.3 Патогенетические механизмы развития эпилепсии

К основным молекулярным механизмам повышения возбудимости нейронов при эпилепсии относятся нарушения функционирования ионных каналов, в том числе каналопатии, и нарушение баланса возбуждающей и тормозной нейромедиаторных систем. Эти нарушения приводят к пролонгированной деполяризации мембраны нейронов, на фоне которой происходят серии «разрядов» (генераций потенциала действия), распространяющихся из первичного эпилептического очага по нервной системе.

Нарушение функционирования ионных каналов

Изменения активности и/или количества потенциалзависимых ионных каналов, в частности, Na-, K- и Ca-каналов приводят к повышению входа в клетку ионов Na+ и Ca2+ и выходу из клетки ионов K+ [286] из-за чего, в итоге, снижается потенциал покоя и порог возбуждения нейронов. Кроме того, повышение внутриклеточной концентрации Ca2+ активирует выброс глутамата, снижает уровни ГАМК и запускает провоспалительные сигнальные каскады [257]. Каналопатия лежит в основе генетической эпилепсии, при которой были найдены мутации в генах, экспрессирующих каналы калия, натрия, хлорида, кальция, но также встречается в приобретенной эпилепсии из-за вторичных изменений в ионных каналах через транскрипционные и посттрансляционные механизмы [229].

Модуляция натриевых (Na+) – каналов. Потенциалзависимые Na+-каналы в головном мозге модулируются посредством активации систем вторичных мессенджеров либо физиологическими, либо патологическими (эпилептическими) событиями [119]. В частности, опосредованное протеинкиназой С (PKC) фосфорилирование каналов изменяет свойства натриевых токов (INaT), способствуя инактивации Na+ каналов при деполяризованных мембранных потенциалах [163] и снижению натриевого тока [120]. Этот эффект сравним с эффектом ряда противоэпилептических препаратов, которые в основном действуют путем стабилизации инактивированного состояния канала, и поэтому одновременное действие активации PKC и противоэпилептических препаратов может привести к кумулятивному ингибирующему эффекту на InaT [140]. Модулирующим влиянием на натриевый ток обладает также тиротропин-релизинг гормон (ТРГ), который синтезируется во многих областях мозга, в том числе в гиппокампе. Большое количество рецепторов ТРГ (I и II типы) содержатся в прекомиссуральном гиппокампе и в парагиппокампальной области – субикулуме (subiculum), лимбической структуре, которая содержит проводящие пути гиппокампа и энториальной коры, что поддерживает синхронизацию нейрональной активности на высоком уровне. Эти характеристики делают субикулюм потенциальной мишенью для генерации синхронизированных эпилептических типов разрядов, спонтанная межприступная активность регистрируется даже у препаратов срезов субикулюма человека [365]. Показано, что ТРГ уменьшает судороги, вызванные пентилентетразолом, и устраняет эпилептическую активность в модели киндлинга миндалевидного тела [302]. Активация ТРГ рецепторов негативно модулирует натриевый ток в гиппокампальных нейронах и это действие ТРГ опосредуется через протеинкиназу С (PKC) [316]. Кроме того PKC ответственна за эндоцитоз GABAA-рецепторов. PKC в норме связывается с субъединицей β3 рецептора GABAA и фосфорилирует ее, тем самым предотвращая ее ассоциацию с клатриновым адаптером AP2 и последующую

интернализацию рецептора. Недостаточность функциональной активности PKC приводит к снижению экспрессии рецептора ГАМК на поверхности мембраны, что связано с чрезмерным эндоцитозом и приводит к нарушению ГАМКергического ингибирования.

Регуляция pH: натриевые обменники и карбоангендраза

В регуляции возбудимости нейронов участвуют механизмы регуляции pH, которые включают переносчики бикарбоната натрия, обменники хлорида-бикарбоната, карбоангидразы и натрий-протоновые обменники (NHE). Семейство мембранных транспортеров NHE использует Na+-градиент, направленный извне внутрь клетки, для управления утечкой H+ из клеток. При эпилепсии известны дисфункций изоформ семейства NHE - NHE1, NHE6 и NHE9. В ЦНС наиболее распространенна изоформа NHE1, ее недостаток приводит к защелачиванию среды (pHo), что может снизить порог инициации или распространения синхронных эпилептических разрядов. NHE6 и NHE9 важны для регуляции доставки белков, активности ферментов, деградации и рециркуляции эндосом, а также поглощения молекул, таких как глутамат. Мутации NHE6 и/или NHE9 приводят к аномальному накоплению глутамата и эпилепсии. Дисфункция NHE6 у пациентов с мутациями SLC9A6 также связана с X-сцепленным синдромом Ангельмана и проявляется эпилепсией, аутистическим поведением, умственной отсталостью и атаксией. Взятые вместе, эти новые данные иллюстрируют значение членов семейства NHE в регуляции гомеостаза H+ в ЦНС и причинно-следственную связь между их дисфункцией и развитием эпилепсии и связанных с ней нарушений головного мозга. Лучшее понимание механизмов, лежащих в основе дисфункций NHE1, NHE 6 и NHE9 при формировании эпилепсии, может определить новые стратегии развития терапии эпилепсии [376].

Карбоангидразы (КА), относятся к цинк-содержащим ферментам, регулируют гомеостаз и транспорт CO2 в клетке, осуществляя контроль ионного состава и сдвиг pH в головном мозге. Карбоангидразы (КА) катализируют обратимую гидратацию/дегидратацию CO2/HCO3, осуществляя pH-буферизацию вне- и внутриклеточных пространствах. Таким образом, они вовлечены в те физиологические и патологические процессы, в которых важную роль играет буферизация клеточного pH. Несколько изоферментов КА вносят существенный вклад в эпилептиформную активность. Селективные ингибиторы КА по отношению к типам изоформ II, VII и XIV (КА II, КА VII и КА XIV) используются в качестве противосудорожных средств при лечении эпилепсии.

pH и активация Ca^{2+}-каналов. При эпилептических припадках развивается ацидоз мозга, который является результатом накопления молочной кислоты [366], вызывающий медленное

закисление. Снижение pH в головном мозге в основном активирует проницаемые для кальция каналы ASIC1a (acid-sensing ion channels), что приводит к накоплению кальция и опосредованному ацидозом повреждение нейронов [197].

Роль глутаматергической системы

Одним из путей индукции эпилептогенеза является чрезмерная активация ионотропных глутаматных рецепторов, NMDA и AMPA, которая развивается в острой форме во время и после эпилептического припадка. Показано количественное увеличение ионотропных NMDA-рецепторов в мозгу у больных эпилепсией и у животных на многих моделях эпилепсии, которое сопровождается изменением субъединичного состава, в основном, за счет увеличения кальций-проницаемых субъединиц [219, 274]. Одновременно с этим изменяются характеристики метаботропных глутаматных рецепторов II типа (mGluRII), расположенных на пресинаптической мембране и контролирующих активность глутаматергических синапсов [108, 362]. Подобные количественные и качественные перестройки ионотропных и метаботропных глутаматных рецепторов приводят к повышению интенсивности глутаматергической сигнализации, делая ткани мозга более возбудимыми.

Конкурентные и неконкурентные блокаторы каналов NMDAR проявляют мощную противосудорожную активность в моделях на животных [144]. Кетамин и мемантин эффективны для контроля полирезистентной эпилепсии у детей и взрослых [159]. Однако из-за побочных эффектов лечение эпилепсии хроническими селективными антагонистами NMDAR в большинстве случаев не оправдало ожиданий клиницистов [310]. Ограничить активность NMDAR возможно за счет непрямого ингибирующего влияния других рецепторов.

Активность глутаматных NMDAR негативно регулируется рецепторами, связанными с G-белком, включая каннабиноидный рецептор 1-го типа (CB1R), мускариновый рецептор ацетилхолина 1-го типа [181], серотониновый 5HT1A-рецептор [372], адренергические рецепторы α1 и α2 [373], дофаминовые рецепторы D2/3 и D4 [25, 262] и рецепторы mGluR7 группы III [362] и mGluR2/3 группы II [129]. Существуют рецепторы, связанные с G-белком, которые усиливают поток кальция NMDAR с помощью нерецепторных тирозинкиназ, таких как Src и Fyn [317], и с помощью серин- и треонинкиназ, таких как PKC и PKA [313]. К ним относятся мю-опиоидный рецептор (MOR) [133], дофаминовый D1-рецептор [208], метаботропные глутаматные рецепторы группы I (mGluR1/5) [188].

Кроме того, антогонисты сигма рецепторов влияют на регуляторное взаимодействие с субъединицей NMDAR NR1, нарушая ассоциацию σ1R-NR1, как это было показано для фенфлурамина и селективного агониста σ1R S1RA [308]. Известно, что антагонисты σ1R нарушают отрицательную обратную связь глутамата при опиоидной анальгезии, облегчая вход

негативных регуляторов NMDAR, вероятно, нарушая связь Ca(2+)-CaM, и предотвращают взаимодействие NR1 с HINT1 [309]. Роль σ1R в противосудорожной активности не до конца изучена. Однако есть данные показывающие, что антагонизм фенфлурамина в отношении σ1R способствует уменьшению судорожных реакций, вызванных введением NMDAю

Роль ГАМКергической системы

Некоторые мутации в генах, кодирующих субъединицы ГАМКА рецептора α1, α6, β2, β3, γ2 или δ, были обнаружены как на животных моделях эпилепсии, так и у пациентов с эпилепсией [198]. Точно так же синдром Драве, также известный как тяжелая миоклоническая эпилепсия в младенчестве (SMEI), представляет собой форму эпилепсии, которая поражает детей в возрасте примерно 1 года в результате мутаций в генах, кодирующих субъединицы α1, β1, β2 и γ2. ГАМКА рецептора[192]. Следует отметить, что несколько мутаций, связанных с эпилепсией, приводят к аномальному перемещению рецепторов и, таким образом, частично или полностью нарушают их экспрессию на синаптической плазматической мембране [217, 265].

Снижение возбудимости нейронов, имеющее антиэпилептический эффект, основано в основном на действии ГАМКегической системы. При развитии эпилепсии наблюдается снижение количества и изменение субъединичного состава GABAA-рецепторов, в том числе с участием ERK1/2, что было продемонстрировано как на людях, так и на животных моделях [166]. В некоторых случаях показано снижение продукции ГАМК и/или повышение обратного захвата ГАМК в синапсах [329, 270]. Кроме того, при некоторых формах эпилепсии показана избирательная гибель ГАМК-эргических тормозных нейронов (при аномалиях развития нервной системы, или вследствие нейротоксических эффектов воспаления) с повышением возбудимости контролируемых ими нервных контуров [176]. Таким образом, снижение или потеря ГАМКергического ингибирования увеличивает вероятность генерации возбуждающих постсинаптических потенциалов и синхронизации разрядов и, следовательно, индуцирует эпилептогенез. Например, исследование [146] обнаружили миссенс-мутацию в гене GPHN, кодирующем белок гефирин, у пациента с синдромом Драве. Гефирин является основным белком, который кластеризует и стабилизирует ГАМКА рецепторы на тормозных постсинаптических мембранах центральной нервной системы. Более того, в течение эпилептогенного периода экспрессия белка гефирина постепенно снижается в неокортексе, прежде чем вернуться к исходному уровню в хронической фазе. Эти данные свидетельствуют о том, что подавление субъединиц ГАМКА рецепторов или их взаимодействующих элементов, которые играют функциональную роль в активности рецепторов, таких как гефирин, может быть причиной заболевания и, следовательно, может быть использовано в качестве мишеней для лекарственных средств [174].

Роль дофаминергической системы

Дофаминергическая система также принимает участие в регуляции глутаматергической синаптической нейропередачи. NMDA-опосредуемая нейротрансмиссия регулируется D_2 и D_1 рецепторами. В тканях мозга передача сигналов от D1-подобных рецепторов будет стимулировать активность NMDA рецепторов и является «проэпилептогенной», тогда как передача сигналов от D_2-подобных рецепторов оказывает «антиэпилептогенное» действие [112, 168]. Известно, что в стриатуме выявляется одна из самых высоких концентраций D_2-рецепторов, тесно колокализованых с D_1-рецепторами, расположенных на ингибиторных ГАМК-ергических нейронах. Дисбаланс D_2/D_1 рецепторов в лимбических структурах приводит к ослаблению торможения возбуждающих сигналов и, как следствие, к повышенной нейрональной возбудимости, что отмечается как у больных эпилепсией, так и у модельных животных [368]. Передача сигналов через D1 рецепторы стимулирует митогенактивируемые киназы (ERK1/2) [167, 168] и экспрессию NMDA-рецепторов и ряда ионных каналов, приводя к повышению синаптической возбудимости [273,290]. ERK1/2 фосфорилирует синапсин I, способствуя выбросу глутамата из пресинаптических везикул [250]. Стимуляция D2/D3-зависимого пути производит обратный эффект, угнетает активность ERK1/2 киназ и уменьшает выброс глутамата [100, 112, 178]. Изменение функциональной активности ERK1/2 киназ наблюдается при судорожных состояниях, вызванных, например, пилокарпином или каинатом, в большой популяции нейронов [196]. У линии крыс с аудиогенной эпилепсией Крушинского-Молодкиной после аудиогенного судорожного припадка отмечается усиление активности ERK1/2 киназ и связанного с ними синапсина 1 в нигростриарной системе [152, 178]. Электроконвульсивный шок (тест МЭШ) также усиливает фосфолирирование митогенактивироованых киназ [339]. Известно, что вальпроевая кислота усиливает подавление каскада передачи сигналов цАМФ, активируя D2 рецепторы и увеличивая их экспрессию [239]. Модулирующим D2-подобные рецепторы механизмом действия обладает и противоэпилептический препарат фенитоин. Таким образом, ингибирование функциональной активности ERK1/2 киназ может быть перспективной мишенью для разработки противоэпилептических препаратов.

Кроме того, MAPK киназы, как общий регулятор экспрессии генов, активирует транскрипционный фактор CREB, что приводит к повышению продукции BDNF и росту мшистых волокон, и также способствует развитию эпилепсии, как по клиническим данным, так и в моделях эпилепсии [345, 379]. Несмотря на то, что нейротрофические факторы (BDNF и NGF) предотвращают гибель нейронов, и обнаружена их эффективность в профилактике нейродегенеративных процессов в головном мозге, сложная система передачи сигнала через Trk и p75 пути ставят под сомнение возможность их использования в случае гибели нейронов в

результате длительной судорожной активности. Было показано, что BDNF и NGF способны усиливать спрутинг мшистых волокон в гиппокампе и оказывать проэпилептогенный эффект [84, 353].

Наконец, ERK1/2 фосфорилирует синапсин I, напрямую способствуя выбросу глутамата из пресинаптических везикул [251]. Многочисленные данные демонстрируют, что ингибиторы сигнальных путей MAPK могут иметь антиэпилептогенный эффект, некоторые из них проходят клинические испытания [121, 171, 178, 207, 365, 268].

Известно, что активация D2R способствует встраиванию GABAAR в мембраны и образованию новых тормозных синапсов [243]. Дисбаланс D1/D2 в сторону уменьшения второго типа рецепторов, наблюдаемый при судорожных состояниях, способствует снижению внутриклеточных кальциевых реакций и запускаемой положительной модуляции ГАМКА рецепторов, включая экспрессию и транспорт рецепторов на мембрану [369]. Мыши с нокаутом D2R демонстрируют ослабленную ГАМКергическую нейротрансмиссию [88], в то время как длительная активация D2R увеличивает плотность постсинаптических кластеров GABAAR в стриарных нейронах (MSN) [234]. Таким образом, передача сигналов от D_2-подобных рецепторов оказывает «антиэпилептогенное» действие за счет как угенетения выброса глутамата через NMDA рецепторы, так и увеличения экспрессии и транспорта ГАМК рецепторов в постсинапсе.

Роль серотонинергической системы

В эпилептогенезе задействуется также серотонинергическая система. Сведения о влиянии серотонергической системы на трансмиссию глутамата и судорожную активность, несмотря на множество работ, очень противоречивы. С одной стороны, серотониновые рецепторы участвует в регуляции судорожных порогов, а препараты с серотонергическим механизмом действия, например, флуоксетин и сертралин, снижают выраженность судорожных реакций. Постулируется, что увеличение концентрации серотонина (5-НТ) в ЦНС, вызванное ингибиторами обратного захвата серотонина (СИОЗ) или за счет введения большего количества триптофана в рацион, обуславливает их противоэпилептическую активность, а дефицит серотонина приводит к снижению судорожного порога [96]. С другой стороны, прижизненные и посмертные исследования в тканях мозга пациентов эпилепсией выявили усиление метаболизма серотонина в эпилептических зонах мозга [125]. Известно, что значительная часть возбуждающих пирамидных нейронов коры экспрессирует 5-НТ2А-рецептор, который, в свою очередь, оказывает возбуждающее действие на экспрессирующие его клетки, усиливая глутаматергические спонтанные возбуждающие постсинаптические токи (EPSC). В тоже время активация 5-НТ2А-рецепторов, расположенных на интернейронах ГАМК в голубом пятне

(Locus Coeruleus, LC), снижает скорость возбуждения нейронов дорсального ядра шва (DRN) и их корковых проекций. Такое же облегчение ГАМКергического ингибирования, за счет увеличения частоты и амплитуды спонтанных тормозных постсинаптических токов (sIPSC), было продемонстрировано в миндалевидном теле и гиппокампе [234]. Серотонин (5-НТ) увеличивает глутаматергические спонтанные возбуждающие постсинаптические токи (EPSC) в пирамидных нейронах префронтальной коры и этот эффект опосредован участием 5-$НТ_{2А}$-рецепторов [130]. При этом активация 5-$НТ_{2А}$-рецепторов в модели абсансной эпилепсии (у крыс линии GAERS) усиливает тормозные постсинаптические токи (IPSC) таламокортикальных нейронов, уменьшая выраженность абсансов [139].

Участие процессов нейровоспаления и нейродегенерации в эпилептогенезе

Помимо собственно нейронов важную роль в эпилептогенезе играет глия. В частности, реактивированные астроциты повышают концентрацию глутамата и ионов К+ в нервной системе, способствуя распространению возбуждения [336, 303, 359]. Нейровоспаление принимает непосредственное участие в эпилептогенезе и последующей нейродегенерации, вызванной каскадом воспалительных явлений, которые могут рекрутировать нейроны и активировать иммунную систему. При этом активация астроцитов и микроглии способствует высвобождению цитокинов и соответствующих сигнальных молекул, в результате чего цитокины IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, TNFα (фактор некроза опухоли) сверх экспрессируются в областях мозга, участвующих в генерации и распространении эпилептической активности [371]. Активация микроглии вносит дополнительный вклад в фармакорезистентность эпилепсии. Так, IL-1β и TNFα усиливают приток ионов кальция в нейроны через активацию глутаматергических рецепторов и, в конечном итоге, способствуют повышенной возбудимости нейронов [358]. В настоящее время на лабораторных моделях и в ряде клинических испытаний показано противоэпилептическое действие ряда противовоспалительных препаратов, в частности, антагонистов IL-1β, НПВП и моноклональных антител к TNFα [357].

Нейровоспаление и нейродегенерация, развивающиеся вследствие судорог, ишемии, геморрагического инсульта или травм, сопровождаются характерным повреждением структуры тканей головного мозга, так называемым астроглиотическим рубцеванием, приводящим к еще большему снижению судорожного порога при эпилепсии и являющимся результатом избыточной пролиферации астроцитов и высвобождения токсичного эпилептогенного гемосидерина (компонент гемоглобина) в случаях геморрагического инсульта или церебральных травм. Через 2 часа после событий, приводящих к дефициту мозгового кровообращения (ишемия, инсульт, травма), наблюдается недостаточность плазматических мембран, цитотоксический отек клеток и внутренних органелл. Запускаемая клеточная гибель

по типу некроза или апоптоза сопровождается выбросом большого количества глутамата и токсинов в окружающие ткани. Последующая активация глутаматных рецепторов вызывает клеточное повреждение, накопление активных форм кислорода, снижение внутриклеточного K+ и усиление токсического притока Zn2. Некроз является преобладающим механизмом, который следует за острой, постоянной окклюзией сосудов, тогда как более легкое повреждение, особенно в ишемической полутени, часто приводит к апоптозу. При этом маркеры апоптоза и некроза могут присутствовать в одной и той же клетке, и это означает, что одновременно могут происходить оба процесса. Кроме того, при астроглиотическом рубцевании тканей в результате церебральных повреждений в тканях мозга происходит повышение уровня экспрессии аденозинкиназы (ADK), приводящее к снижению концентрации аденозина и уровня АТФ, что самого по себе является достаточным для инициации судорог, как это было показано на трансгенных животных с избыточной экспрессией ADK [153]. При этом уровень мРНК ADK может выступать в качестве маркера эффективности терапии на различных моделях эпилепсии.

Роль окислительного стресса в эпилептогенезе

Окислительный стресс участвует в патогенезе многих неврологических заболеваний, таких как инсульт, ишемия, нейродегенеративные расстройства (эпилепсия, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, аутизм и др. [85]. Повреждение головного мозга в результате судорог является динамическим процессом, включающим множество факторов, способствующих гибели нейрональных клеток. Биохимический каскад гибели нейронов включает перекисное окисления липидов (ПОЛ), повреждение митохондриальной ДНК [161] и усиленный приток Ca^{2+} [164]. Перегруженный Ca^{2+} митохондриальный матрикс активирует процесс усиленного образованию активных форм кислорода (АФК), продукты которых повреждают клеточные компоненты, белки, липиды и ДНК, что и приводит к гибели клетки [191]. При нормальных физиологических условиях супероксидный радикал (•O2) и перекись водорода (H2O2) не способны быстро окислять подавляющее большинство органических соединений. В биологических системах ионы железа Fe2+ катализируют реакции, в которых участвуют •O2 и H2O2, способствуя превращению их в АФК и индуцируя ферроптоз. В норме железо никогда не находятся в абсолютно свободной форме, образуя в клетке хелаты с молекулами ряда органических соединений, например, с цитратом или аденозиндифосфатом, представляя собой ферритин (445 кДальтон), содержащий железо в нетоксичной растворимой трехвалентной форме (Fe3+) [80]. Установлено, что для инициирования перекисного окисления липидов (ПОЛ) необходимо оптимальное соотношение Fe3+ к Fe2+, равное 1:1 [267]. Сверхэкспрессия ферритина и ферроптоз вызывают развитие эпилепсии [215]. В модели

пилокарпиновых судорог сверхэкспрессия ферритина наблюдается в гиппокампе и энторинальной коре и наиболее выражена у крыс с прогрессирующей формой эпилепсии и с частыми припадками [179]. В ex vivo экспериментах стимуляция острых срезов мозга с эпилептиформированными агентами глутаматом или 4-аминопиридином также приводила к высокому поглащению железа и индукции экспрессии провоспалительных цитокинов [134]. Авторы полагают, что приток и накопление железа может быть связано с нарушенным ГЭБ и изменениями метаболизма железа при эпилепсии. А частота и продолжительность судорог связаны с развившимся астроглиозом и прогрессирующей дисфункцией ГЭБ. В посмертных тканях головного мозга больных височной эпилепсией и умерших после эпилептического статуса установлено, что нейроны и астроциты накапливают железо во время приступов, приобретая пикнотическую морфологию. Накопленное железо может трансформировать астроциты в высокорезистентный провоспалительный фенотип, потенциально способствующий проэпилептогенным воспалительным процессам [380]. У больных височной эпилепсией также содержание железа в мезиальном отделе височной доли положительно коррелирует с длительностью заболевания [311].

О тяжести свободно-радикальных реакций и процессов ПОЛ можно судить по состоянию антиоксидантной защиты мозга, в частности активности антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза. Считают, что клиренс АФК в организме человека в основном зависит от уровня глутатиона (GSH), который является субстратом для глутатион пироксидазы (GPX4) и может снижать заболеваемость ферроптозом [352]. Нормальные уровни глутатиона зависят от работы цистин-глутаматной транспортной системы (SLC7A11). SLC7A11 усиливает поглощение цистеина и биосинтез глутатиона, тем самым ингибируя окислительный стресс и ферроптоз [253]. При аномалиях активности цистин-глутаматной транспортной системы, наблюдаемых в некоторых формах эпилепсии, снижается продукция глутатиона (GSH) и повышается уровень АФК и ПОЛ, что приводит к возникновению ферроптоза [73, 165]. Активность других антиоксидантных ферментов головного мозга, таких как супероксиддисмутаза и каталаза при эпилепсии также значительно снижена [300]. Участие АФК и окислительного стресса в развитии судорог косвенно подтверждается противосудорожной активностью антиоксидантов и антигипоксантов. Применение антиоксиданта мексидола позволяет усилить эффективность терапии ПЭП в экспериментальных моделях эпилепсии [11] и в клинической практике [75]. Мексидол обладает антиоксидатной активностью за счет прямого взаимодействия с супероксидным радикалом и способен увеличивать активность глутатион пероксидазы, подавляя $НАДФН_2$-зависимое железо-индуцируемое ПОЛ в гомогенатах мозга [83]. Антиоксидант ферростатин-1 (3-Amino-4-cyclohexylaminobenzoic acid ethyl ester) ингибирует

ферроптоз и защищает гиппокамп в каиновой модели эпилепсии, восстанавливая уровни глутатиона и глутатион пероксидазы [300]. Исследования показали, что антиоксидант EPC-K1, являясь калиевой солью α-токоферола и L-аскорбиновой кислоты, элиминирует гидроксильные радикалы и защищает от окисления мембраны нейрональных клеток, предотвращая эпилептические разряды, вызванные ионами железа [277]. Действие известных ПЭП на окислительный стресс при эпилепсии носит как позитивный, так и негативный характер. Показано, что длительная монотерапия вальпроатами в течение 6-12 месяцев приводит к значительному снижению маркеров оксидативного стресса у пациентов с эпилепсией и увеличению активности супероксиддисмутазы и каталазы в мозге [103]. Однако в отношении уровней глутатион пероксидазы вальпроаты имеют негативное влияние [374]. Кроме того, вальпроаты имеют побочные эффекты, приводящие к гипоксическим явлениям и снижению активности ферментов антиоксидантной защиты в тканях печени и почек [157]. Применение вальпровой кислоты у пациентов способствует усиленному метаболизму железа при эпилепсии, что приводит к образованию не связанного с трансферрином железа (NTBI) и увеличению окислительного стресса [285]. Фенобарбитал, фенитоин и карбамазепин также повышают уровни индекса оксидативного стресса в мозге пациентов с эпилепсией [93]. ПЭП второй и третей генерации, такие как зонисамид, лакосамид, топирамат не снижают редокс-потенциала нейронов, а наоборот, повышают активность и уровни ферментов антиоксидантной защиты мозга, снижая АФК [331].

Роль аберрантного нейрогенеза при эпилепсии

Долговременные изменения мозга после судорог включают синаптические перестройки, гипертрофию глиальных клеток, изменение белков цитоскелета и порождают судороги, образуя новые возбуждающие глутаматные синапсы, которые участвуют в генерации последующих судорог [102, 223]. Каскад активируется повышенным уровнем внутриклеточного кальция, что приводит к росту аксонов и образованию новых синапсов. Новые синапсы аберрантны, так как содержат ионотропные глутаматные рецепторы, отсутствующие в нормальных синапсах и облегчающие генерацию судорог [26]. Синапсы, содержащие ГАМКА-рецепторы также существенно изменяются при судорогах, приводя к потере тормозного тонуса. Пластичность ГАМКергических синапсов меньше, чем глутаматергических, а погибающие в результате избыточного возбуждения ГАМКергические интернейроны и синапсы, как правило, не восстанавливаются. Terunuma et al. и его коллеги исследовали механизмы, лежащие в основе появляющегося состояния дефицита ГАМК-рецепторов при эпилепсии на модели пилокарпиновых судорог. Установлено, что у мышей непрекращающиеся припадки 5-й степени сопровождаются изменением состава субъединиц рецептора ГАМКА в гиппокампах через 1 час

после начала судорог: отмечалось уменьшение бета (β) и гамма (γ) субъединиц и увеличение дельта (δ). При этом нарушалось синаптическое торможение, так как бензодиазепин-чувствительные ГАМК-рецепторы в тормозных синапсах чаще всего содержат γ-субъединицы, а не δ. Кроме того, с помощью электрофизиологических методов исследования был выявлен постсинаптический дефект ответов ГАМК-рецепторов. Дополнительные исследования показали, что гипоактивность изоформ протеинкиназы С (PKC) ответственна за недостаточное фосфорилирование GABAA-рецепторов и последующий эндоцитоз этих рецепторов. В норме PKC связывается с субъединицей β3 рецептора GABAA и фосфорилирует ее, тем самым предотвращая ее ассоциацию с клатриновым адаптером AP2. Этот процесс является критическим для интернализации рецептора. Если фосфорилирование не происходит, снижается экспрессия рецептора ГАМК на поверхности мембраны, что приводит к нарушению ГАМКергического ингибирования.

Зрелые эпилептические нейронные сети принципиально отличаются от сетей до судорожной активности, в их состав входят нейроны с новыми рецепторами, ионными каналами и другими белками. В аберрантной нейрональной реорганизации эпилептического гиппокампа участвуют как предсуществующие, так и вновь образованные гранулярные нейроны [186]. Острая судорожная активность многократно усиливает пролиферацию в субгранулярной нейрогенной нише и вызывает аберрантную миграцию новых нейронов в хилус, способствуя формированию эпилептических нервных сетей в поврежденном гиппокампе. Усиленный нейрогенез в субгранулярной нейрогенной нише и избыточное число клеток в гранулярном слое вызывают дисперсию (разобщение) клеток в гранулярном слое. Длительные судороги нарушают миграцию предшественников гранулярных нейронов, и вместо гранулярного слоя клетки встраиваются в хилус зубчатой извилины, которые и дают начало эктопическим гранулярным клеткам хилуса. Эти нейроны аномально встраиваются в сети, способствуя формированию гипервозбудимости. При хронизации эпилептического процесса уровень пролиферации становиться ниже нормальных значений и нейрогенез снижается. Эктопические гранулярные клетки хилуса формируют аксональные контакты с мшистыми волокнами гранулярных клеток поля CA3 и ГАМК-интернейронами, образуя стабильные циклические связи, аномально и чрезмерно представленные в эпилептизированном мозге по отношению к здоровому [142, 320]. Кроме того, аномально разветвленные аксоны гранулярных клеток зубчатой извилины вместо пирамидных клеток гиппокампа иннервируют молекулярный слой зубчатой извилины. В результате происходит синхронизация и генерация электрической активности с развитием эпилептического приступа. Возможно также нарушение кортикальной архитектоники и увеличение количества эктопических нейронов в белом веществе височной доли [261].

Участие цинка в эпилептогенеза

Белки цинковых пальцев (ZNF) являются одними из самых распространенных белков в геномах эукариот. ZNF связаны с неврологическими заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера (БА), инсульт, шизофрения, депрессия, тревога, травма, эпилепсия, аутизм [116].

Цинк играет важную роль в патофизиологии судорог и эпилепсии. Возможная связь между цинком и эпилепсией подтверждается тем фактом, что самые высокие уровни цинка в мозге находятся в гиппокампе [289], одной из наиболее широко изученных областей мозга в отношении эпилепсии, структурные изменения в которой часто наблюдаются у пациентов с наиболее резистентной формой к лечению эпилепсии, мезиальной височной эпилепсии [141]. Подавляющее большинство цинка связано с белками и изолировано в органеллах и везикулах [156]. На клеточном уровне гомеостаз цинка поддерживается транспортерами ZnT и ZIP и металлотионеинами (MT). Транспортеры ZnT снижают внутриклеточную концентрацию цинка, способствуя оттоку цинка из клеток или во внутриклеточные везикулы, в то время как транспортеры ZIP повышают внутриклеточную концентрацию цинка [150, 255]. Регуляция гена CaV3.2 находится под контролем цинк-чувствительного фактора транскрипции MTF1 [175, 184]. У экспериментальных животных активация транскрипции Ca2 + -каналов CaV3.2 T-типа, опосредованная фактор MTF1, приводит к повышенной разрядной активности нейронов гиппокампа и является важным триггером эпилептогенеза. Результаты исследования резецированного гиппокампа больного рефрактерной височной эпилепсиией подтверждают каскад - Zn^{2+} -MTF1-CaV3.2, тем самым открывая новые возможности для предотвращения и лечения фармакологически резестентных форм эпилепсий [354]. Кроме того, анализ уровней экспрессии CaV3.2 и MTF1 в гиппокампе у пациентов с эпилепсией со склерозом гиппокампа продемонстрировал положительную корреляцию между уровнями MTF1 и CaV3.2 [150].

Взаимодействие между кальциевыми каналами T-типа и калиевыми каналами M-типа в отношении действия цинка было продемонстрировано Huang et al. (2016). Усиление M-каналов и ингибирование T-каналов вносят вклад в окислительно-восстановительный антиноцицептивный эффект нейропептидной субстанции P в периферических нервах. Вещество P способно модулировать активность каналов T-типа в ноцицепторах, отключая чувствительность каналов к цинку с помощью редокс-зависимого механизма [201]. Другой пример возможного взаимодействия между этими каналами был предложен Martinello (2015), который сообщил, что активация ацетилхолином мускариновых рецепторов M1 во взрослых гранулярных клетках гиппокампа увеличивает функцию аксональных кальциевых каналов T-типа, что, в свою очередь, повышает базальные уровни кальция в аксонах и приводит к ингибированию аксонального тока Kv7/M, снижая порог спайка в гранулярных клетках.

Судороги, вызванные каинатом, связаны со снижением концентрации цинка в головном мозге [344].

Пресинаптические клетки упаковывают цинк через транспортер Znt-3 в синаптические пузырьки вместе с нейротрансмиттерами. После высвобождения эти нейротрансмиттеры связываются с рецепторами NMDA и возбуждают постсинаптическую клетку. Но если активируется слишком много рецепторов NMDA, нервный потенциал становится чрезмерным, вызывая эксайтотоксичность и судороги. Ионы цинка ослабляют действие нейротрансмиттеров, связываясь с рецепторами NMDA и блокируя некоторые из них, а хелатирование ионов цинка усугубляют судорожную активность [150].

Решающее значение для ГАМКергического ингибирования имеет внеклеточный цинк, который, активируя рецептор GPR39 (G protein-coupled receptor 39, zinc sensing receptor), приводит к усилению активности KCC2 (котранспортера хлорида калия 2). KCC2 представляет собой экструдер хлорида, специфичный для нейронов, который использует градиент калия для поддержания низкого уровня внутриклеточного хлорида. Давно установлено, что направленный наружу электрохимический градиент хлорида через мембрану нейрона является фундаментальным для правильного функционирования постсинаптической функции ГАМКА рецептора. Было обнаружено, что делеция KCC2 в культивируемых нейронах гиппокампа увеличивает концентрацию внутриклеточных хлоридов и вызывает дефицит ГАМКергического ингибирования [222]. Локальная абляция KCC2 в гиппокампе приводит к развитию спонтанных, повторяющихся судорог и склерозу гиппокампа. Взрослые мыши с нокаутом GPR39 проявляют повышенную восприимчивость к судорогам, вызванную однократным внутрибрюшинным введением каината, по сравнению с однопометниками дикого типа. При этом уменьшается высвобождение глутамата и синтезируется эндоканабинойд 2-AG (2-арахидоноилглицерин), эндогенный пресинаптический агонист каннабиноидных рецепторов 1 типа (CB1R), оказывающий нейропротективное действие. Таким образом, нарушение внеклеточной передачи сигналов цинка через GPR39 и изменение экспрессии или функции KCC2 связаны с хронической эпилепсией [149]. Изменения чувствительности ГАМКА рецепторов к цинку также наблюдались в модели киндлинга миндалевидного тела и пилокарпин-индуцированной модели эпилептического статуса. Сохранение чувствительности к бензодиазепинам после киндлинга исключало возможность того, что киндлинг вызывает потерю γ-субъединиц, которые имеют решающее значение для чувствительности к бензодиазепинам. Снижение чувствительности токов ГАМК к цинку было отмечено в коре у детей, перенесших эпилепсию, с корковой дисплазией II типа, пороком развития коры, который является распространенной причиной резестентной эпилепсии у детей [260].

Эндогенные нейростероиды, такие как аллопрегнанолон, являются положительными аллостерическими модуляторами синаптических и экстрасинаптических ГАМКА рецептров и, подобно цинку, обладают преимущественным сродством к внесинаптическим рецепторам, содержащим дельта-субъединицу [126]. Данные, как на животных моделях, так и в клинических случаях подтверждают участие нейростероидов в эпилептогенезе. Было показано, что аллопрегнанолон противодействует судорогам, вызванным каиновой кислотой [106]. Цинк демонстрировал зависимую от концентрации, обратимую, неконкурентную блокаду чувствительного к аллопрегнанолону тонического тока в гранулярных клетках зубчатой извилины с IC50 16 мкМ. Кроме того, интрагиппокампальное введение цинка вызывало эпилептиформную активность и блокировало противосудорожное действие аллопрегнанолона в модели гиппокампального киндинга [127]. Таким образом, внеклеточный цинк избирательно ингибирует внесинаптическую δ-субъединицу GABAA рецептора, и тем самым предотвращает нейростероидную активацию тонического торможения и нейростероид-зависимую защиту от судорог.

Активность KCNQ1-KCNQ5 каналов ингибируется за счет стимуляции мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, что снижает PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). Наиболее распространенным каналом в ЦНС, вероятно, является гетеромерный KCNQ2/3 [147]. Каналы KCNQ активируются внутриклеточным цинком, что снижает их зависимость от природного активатора PIP2 [169]. Цинк ингибирует несколько подтипов катионных каналов (TRPM), проницаемых для магния и кальция, и проникает в TRPM7 более эффективно, чем магний или кальций [205]. Активация TRPM участвует в гомеостазе магния, а также в опосредованном кальцием повреждении нейронов [291].

Наблюдения клинических исследований подтверждают связь между цинком и эпилепсией. Проведенный метанализ, который включал 60 статей, опубликованных в период с января 1970 года по август 2013 года, выявил взаимосвязь между уровнями цинка в сыворотке, волосах или спинномозговой жидкостью и эпилепсией или фебрильными судорогами. Снижение концентрации цинка в сыворотке также было установлено у детей с генерализованной неизлечимой эпилепсией по сравнению со здоровыми детьми того же возраста [315, 326]. В исследовании продемонстрионна потенциальная роль цинка в качестве дополнительной терапии у детей с трудноизлечимой эпилепсией.

Таким образом, вне- и внутриклеточный цинк может оказывать противоположное влияние на активность KCC2. Синаптический (внеклеточный) цинк приводит к усилению активности KCC2 и, усилению ингибирования нейронов, в то время как увеличение внутриклеточного цинка может вызывать противоположный эффект, то есть снижение функции KCC2, приводящее к снижению ингибирования. Цинк проникает внутрь клетки в

постсинаптический нейрон через NMDAR, GluA2R, AMPAR, VGCC (потенциалзависимые кальциевые каналы) и TRPM7 рецепторы (временные рецепторные потенциальные меластиновые каналы 7).

Роль миелина в эпилепсии.

Миелиновая оболочка обернута вокруг аксонов клетками-олигодендроцитами, которые могут миелинизировать десятки аксонов одновременно. Миелин содержит 40 % воды, а остальные 60 % сухой массы состоят на 70–85 % из липидов и на 15–30 % из белков [269]. Наиболее важным липидом является холестерин, а наиболее важными белками являются основной белок миелина (MBP) и протеолипидный белок (PLP). Миелин действует как электрический изолятор, обеспечивая более эффективную и быструю передачу электрических сигналов по аксонам. Следовательно, может существовать прямая связь между предрасположенностью к эпилептическим припадкам и аномальным содержанием миелина.

Дефицит миелина и аномальная миелинизация связаны со многими неврологическими и психоневрологическими расстройствами, такими как болезнь Альцгеймера [220, 229], болезнь Паркинсона [145], шизофрения [236] и эпилепсии у детей [155]. Хотя ранее миелинизация не считалась центральным звеном в патогенезе эпилепсии, некоторые формы эпилепсии, например, синдром Веста (инфантильные судороги), связаны напрямую с нарушениями миелинизации у детей [324]. В структуре неврологических расстройств, связанных с аномальным содержанием миелина, наблюдается более высокая предрасположенность к эпилептическим припадкам [183, 203, 238, 287]. Например, у пациентов с рассеянным склерозом (РС) вероятность развития эпилептических припадков выше в 3–6 раз [297] и прогрессирует с течением заболевания [117]. Полагают, что это связано с нейродегенерацией нейронов гиппокампа и корковых нейронов, которая запускается вследствие демиелинизации аксонов мшистых волокон гиппокампа и аксонов моторной коры. Интересно, что у пациентов с РС атрофия коры и потеря нейронов локализована в структурах, связанных с медиальной височной эпилепсией (MTLE) [118], предполагая общность между височной эпилепсией и РС.

Связь между недостаточностью миелина и судорогами также подтверждается у миелин-дефицитных мутантных мышей с тоническими судорогами, у которых лечение противоэпилептическим препаратом фенобарбиталом заметно улучшало выживаемость животных [263]. Появление судорожных эпизодов в животных моделях РС тесно связано с нейродегенеративными изменениями в гиппокампе: выявлены обширные зоны демиелинизации пирамидного слоя в зонах CA1, CA2 и CA3 гиппокампа, потеря парвальбумин-чувствительных (PV+) ГАМК-интернейронов, потеря молекулярного слоя зубчатой извилины, распространенный астроглиоз, инфильтрация микроглии/макрофагов и изменения экспрессии

аквапорина-4 (AQP4) и калиевых каналов Kir4.1. [238]. У большинства демиелинизированных животных, получавших демиелинизирующий агент купризон, наблюдались спровоцированные генерализованные тонико-клонические судороги [200].

Кроме потери миелина в процессе эпилептизации мозга наблюдается абберантная миелинизация, приводящая к увеличению слоев миелина на отдельных крупных аксонах. Так, например, в модели крыс с генетической предрасположенностью к быстрому киндингу миндалевидного тела, получившей название FAST-штамм сообщалось о снижении основного белка меилина (MBP) и протеолипидного белка (PLP) по сравнению с устойчивыми к судорогам крысам (с медленным киндингом миндалевидного тела), получившим название SLOW-штамм [327]. Вместе с тем у склонных к судорогам (FAST) крыс наблюдалось увеличение толщины миелиновой оболочки аксонов в средней линии мозолистого тела [328]. Было высказано предположение, что это увеличение связано с рыхло упакованными миелиновыми волокнами и вызывает повышенную нагрузку на перехваты Ранвье, влияя на общую прочность целостности аксонов. Снижение толщины и объема миелина, а также потеря основного белка миелина (MBP) в гиппокампе через несколько недель после индукции судорог было показано на модели хронической очаговой неокортикальной эпилепсии, литий-пилокарпиновой модели, в модели крыс с электрическим кинлингом [258, 284, 330, 367].

Кроме моторных (тонико-клонических) форм эпилепсии нарушения миелинизации были найдены в моделях абсансной эпилепсии. У крыс линии Wag/Rij (генетическая линия абсансной эпилепсии) в возрасте 6 месяцев, когда частота судорог достигает максимального значения, наблюдается увеличение количества делящихся олигодендроцитов. Абсансы, вероятно, вызывают аберрантную миелинизацию и утолщение миелиновых оболочек, которая усугубляет судорожную активность [173]. Лечение этосукцимидом (300 мг/кг) с 1,5 мес по 6 мес возраста крыс Wag/Rij значительно снижало или полностью прекращало судорожную активность и нормализовало толщину миелиновой оболочки. Подобная аномальная миелинизация была также найдена у мышей с абсансной эпилепсией Scn8a+/mut, несущих гетерозиготную мутацию потенциалзависимого натриевого канала Nav1.6. Мутация привела к дисфункции интернейронов в ретикулярном ядре таламуса, таламокортикальной гиперсинхронизации и спонтанным абсансным приступам с частотой 4–8 Гц. Показано, что абсансы индуцируют повышенную пролиферацию олигодендроцитов вместе с аномально повышенной миелинизацией (увеличивается толщина стенки миелина) в пораженной таламокортикальной сети мышей Scn8a+/mut [228]. Аберрантные паттерны нейрональной активности могут индуцировать олигодендрогенез, аномальную миелинизацию и демиелинизацию нейрональных аксонов в судорожных сетях. А аберрантная миелинизация, в свою очередь, может

способствовать последующей неадекватной пластичности нейрональной сети и прогрессированию эпилепсии.

Таким образом, можно резюмировать, что основными причинами развития эпилепсии являются нарушения контроля глутаматергического возбуждения и ГАМКергического торможения, нормальной функционирования активности ионных каналов (как рецепторных, так и потенциалзависимых), что приводит к частичной деполяризации мембраны нейрона в состоянии покоя и снижению порога возбуждения. Эти нарушения могут быть следствием мутаций генов, кодирующих сами ионные каналы или рецепторные субъединицы, изменений активности сигнальных каскадов, регулирующих их экспрессию, метаболических нарушений или мутаций, ведущих к нарушению развития нервной системы с последствиями в виде преобладания возбуждающих нейронов над тормозными или избыточного астроглиоза, а также в результате транскрипционных и трансляционных изменений, вызванных факторами извне (травма, инсульт, ишемия, инфекция, алкоголь и т.д).

1.4 Противоэпилептические препараты (ПЭП)

Современное лечение эпилепсии представляет собой комплекс мероприятий, фармакологических и немедикаментозных, направленных на уменьшение, эпилептических припадков и, в целом, качества жизни. Основная концепция лечения эпилепсии сформировалась в 50-х годах прошлого века и обусловила адекватность лечения в начале заболевания, индивидуальный подход, устойчивость и продолжительность лечения. По данным Всемирной противоэпилептической лекарственной терапии удается добиться полного купирования или значительного уменьшения приступов у 60-65% больных. Несмотря на появление новых ПЭП, около 40% больных эпилепсией не достигают ремиссии (контроля приступов) [27, 38]. Побочные эффекты ПЭП зачастую перевешивают преимущества терапии.

Выбор применения ПЭП в монотерапии или политерапии связан с переносимостью препарата, с течением самого заболевания и риском развития тяжелых побочных эффектов. Монотерапия позволяет избежать использования сложных режимов дозирования, более высокой приверженности пациентов и снижает стоимость лечения по сравнению с политерапией. Политерапия по сравнению с монотерапией может не приносить пользы в плане контроля над возможными эпилептическими припадками и наличия побочных эффектов, но в некоторых случаях позволяет достичь длительной ремиссии [99, 218, 323]. При первичном назначении ПЭП в монотерапии возможна медикаментозная ремиссия в 50% случаев, тогда как политерапия повышает этот показатель до 65%.

Для лечения эпилепсии применяется более 30 ПЭП.

К I группе ПЭП относятся барбитураты, бензодиазепины, этосуксимид, карбамазепин, фенитоин, препараты вальпроевой кислоты. Основными ПЭП из II поколения являются окскарбазепин, леветирацетам, фелбамат, зонисамид, топирамат и др., а из III поколения - эскликарбамазепин, бриварацетам, ретигабин, прегабалин, габапентин и др.

По химической структуре основные противоэпилептические препараты (ПЭП) делятся на:

- - производные барбитуровой кислоты (фенобарбитал и др),
- - производные гидантоина (фенитоин),
- - сукцинимиды (этосуксимид),
- - иминостильбены (карбамазепин, окскарбамазепин, эсликарбамазепин),
- - бензодиазепины (клоназепам и др),
- - вальпроаты (вальпроевая кислота),
- - производные пирролидонов (леветирацетам, бриварацетам),
- - каннабинойды (каннабидиол),
- - сулфаматзамещенные моносахариды (топирамат),
- - производные ГАМК (габапентин, вигабатрин) и
- - разные структуры (ламотриджин, зонисамид, руфинамид и др.).

По механизму действия все ПЭП можно разделить на 4 большие группы в зависисмости от мишени и механизма действия: селективные блокаторы натриевых каналов (дифенин, карбамазепин, ламотриджин, топирамат, вальпроевая кислота), блокаторы кальциевых каналов Т-типа (этосуксимид, триметин, вальпроевая кислота), ГАМК-эргические средства (бензодиазепины, фенобарбитал, вальпроевая кислота, вигабатрин, тиагабин) и глутаматергические средства (ламотриджин, топирамат). Некоторые из ПЭП действуют на несколько мишеней, вследствие чего эти препараты невозможно однозначно отнести к одной из вышеприведенных групп.

В соответствии с преобладающим механизмом действия можно выделить следующие основные группы ПЭП:

1) Блокаторы вольтаж – зависимых натриевых каналов (карбамазепин, ламотриджин, окскарбазепин, фенитоин);
2) ПЭП с множественным (многокомпонентным) механизмом действия с преобладанием (или включением в качестве одного из компонентов) блокады вольтаж-зависимых натриевых каналов (фенобарбитал, топирамат, вальпроаты, зонисамид);
3) ПЭП, усиливающие тормозное (ингибирующее) действие вследствие усиления эффекта гаммааминомасляной кислоты (ГАМК) (клобазам, клоназепам, тиагабин, вигабатрин);
4) Блокаторы кальциевых каналов Т-типа (этосуксимид);

5) ПЭП с модифицирующим влиянием на кальциевые каналы и высвобождение нейромедиаторов (габапентин, прегабалин);
6) ПЭП, связывающиеся с белком синаптических пузырьков SV2A (леветирацетам, бриварацетам);
7) Селективные неконкурентный антагонист рецепторов α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA-рецепторов) (перампанел).

Используемые в настоящее время ПЭП представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Современные противоэпилептические препараты и механизм их действия

Препараты	**Механизм действия**
Препараты 1-го поколения	
Фенобарбитал Примидон (активный метаболит фенобарбитал)	увеличивает продолжительность открытия хлорного канала к $ГАМК_А$-рецептору
Фенитоин	1) инактивирует натриевые вольтаж-зависимые каналы в нейрональных мембранах 2) повышает внеклеточный эндогенный дофамин
Триметадион	ингибирует кальциевый ток через мембранные кальциевые каналы Т-типа
Этосукцимид	снижает низкопороговые Ca^{2+} токи Т-типа
Препараты 2-го поколения	
Вальпроевая кислота	1) повышает уровень нейротрасмиттера ГАМК в головном мозге 2) блокирует натриевые вольтаж-зависимые каналы. 3) повышает концентрацию гомованилиновой кислоты (метаболит дофамина)
Карбамазепин	1) ингибирует натриевые вольтаж-активируемые каналы 2) повышает внеклеточную концентрацию эндогенного дофамина
Клоназепам, Феназепам	усиливает взаимодействие ГАМК с $ГАМК_А$ рецептором
Клобазам	усиливает взаимодействие ГАМК с $ГАМК_А$ рецептором
Фелбамат	точный механизм не установлен, но известно, что препарат анатагонизирует NMDA-рецепторам
Топирамат	1) ингибирует потенциал-зависимые натриевые и кальциевые каналы 2) повышает ГАМК-опосредованную активность 3) ингибирует каинат/AMPA глутаматные рецепторы 4) повышает внеклеточный эндогенный серотонин и дофамин
Леветирацетам	1) действует через опосредованное связывание с визикулярным синаптическим протеином SV2A 2) ингибирует (на 50%) выброс кальция из рианидин-зависимого депо кальция
Окскарбазепин	модулирует вольтаж-чувствительные катионные каналы

Продолжение таблицы 1

Зонисамид	1) ингибирует потенциал-зависимые кальциевые каналы Т-типа 2) связывается с ГАМК-бензодиазепиновым рецепторным комплексом, повышая уровень тормозного нейромедиатора ГАМК в мозге 3) уменьшает внеклеточное высвобождение возбуждающего нейромедиатора глутамата 4) повышает внеклеточную концентрацию эндогенного серотонина и дофамина
Препараты 3-го поколения	
Вигабатрин	необратимо ингибирует ГАМК-трансаминазы
Ламотриджин	1) блокирует натриевые каналы 2) повышает внеклеточный эндогенный дофамин
Прогабид	связывается с $ГАМК_А$ и $ГАМК_В$ рецепторами, расположенными на терминалях первичных афферентных волокон
Тиагабин	селективно ингибирует ГАМК траспортер
Стирипентол	действует на ГАМК-опосредованную передачу, снижает синаптосомальное поглощение ГАМК и вызывает увеличение концентрации ГАМК в головном мозге
Габапентин	1) действует на управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы (HCN) 2) агонист $ГАМК_В$ рецепторов
Ретигабин	активирует потенциал чувствительный, нейрон-специфический ток K^+, усиливая активацию калиевых каналов (KCNQ2 и KCNQ3) с субъединицами (Kv7)
Бриварацетам	1) обладает высокой и селективной аффинностью в отношении белка синаптических везикул 2А (SV2A) 2) ингибирует выброс кальция из рианидин-зависимого депо кальция
Перампанел	1) ингибирует AMPA-индуцированное увеличение внутриклеточного Ca^{2+} 2) селективно блокирует AMPA рецептор-опосредованную синаптическую передачу
Прегабалин	взаимодействует с α2-δ субъединицей P, Q и N – типа потенциал-зависимых кальциевых каналов.
Руфинамид	модулирует активность натриевых каналов, в основном с помощью продления неактивного состояния канала.
Эсликарбазепин	ингибируют Na^+ токи конкурентоспособным взаимодействием с инактивированными потенциал-зависимыми натриевыми каналами в потенциал-зависимом пути
Лакосамид	селективно блокирует медленые натриевые каналы
Каннабидиол	является агонистом каннабинойдных рецепторов I и II типов (CB-1 и CB-1)

К наиболее часто применяемым для лечения эпилепсии ПЭП в Российской федерации относятся вальпроаты, карбамазепин, леветирацетам и топирамат. Рейтинг наиболее часто назначаемых ПЭП за 2015 г возглавила вальпроевая кислота: вальпроаты (80,3%), карбамазепин (22,2%), леветирацетам (18,5%), топирамат (14,8%), вигабатрин (4%), этосукцимид (4%), габапентин (1%), а в последнее время к списку добавился лакосамид.

Протокол назначения ПЭП в РФ. В Российской Федерации (РФ) лечение впервые диагностированной эпилепсии проводят при назначении начальной (стартовой) дозы, которую постепенно увеличивают (титруют) до прекращения приступов или появления побочных эффектов. Наиболее подходящий ПЭП назначают исходя из формы эпилепсии/эпилептического синдрома, типа приступов, стадии и течения заболевания, пола, возраста, коморбидных состояний и других факторов. Примерно 60 - 65% пациентов с эпилепсией достигают стойкой ремиссии или существенного урежения приступов на фоне лечения ПЭП, при этом большинство из них достигают ремиссии на монотерапии. Переход от монотерапии к комбинированной терапии ПЭП или отмена ПЭП зависят от таких критериев как «ремиссия на протяжении 12-месяцев» и «время до первого приступа». При фармакорезестенных эпилепсиях или «псевдофармакорезестентных», как правило, назначают политерапию после не менее чем двух последовательных адекватных попыток применения препаратов в режиме монотерапии [41].

Побочные эффекты ПЭП. ПЭП обладают большим набором побочных эффектов как на нервную систему и психическую сферу, включая когнитивные функции, так и на другие органы и системы. Кроме того, на фоне длительного приема ПЭП могут изменяться электро – клинические паттерны самой эпилепсии, включая ее негативную эволюцию. К наиболее распространенным негативных реакций ПЭП относятся сонливость / усталость, головная боль, желудочно-кишечные расстройства, головокружение / слабость, сыпь. В целом, при приеме ПЭП другие НР возможны со стороны практически всех органов и систем. К серьезным НР относят реакции, представляющие угрозу для жизни больного, такие как тяжелые реакции гиперчувствительности, печеночная недостаточность, гематологические нарушения или ангидроз. В 2019 году на 5-м Европейском конгрессе неврологов в Осло были представлены данные, о тератогенных эффектах не только вальпроатов, но и карбамазепина при их приеме во время беременности. Реакции гиперчувствительности развивается по механизму идиосинкразии и наиболее характерна для карбамазепина, фенитоина, фенобарбитала, ламотриджина. Степень реакции варьирует от кожной сыпи до развития опасного синдрома Стивенса-Джонсона и токсического эпидермального некролиза. Большинство ПЭП метаболизируются при участии ферментов цитохрома печени Р450, являясь либо индукторами, либо ингибиторами и

только 2 ПЭП леветирацетам и ламотриджин метаболизируются без участия этого цитохрома. Фермент-индуцирующие ПЭП (карбамазепин, фенитоин, фенобарбитал и примидон) могут способствовать развитию ряда сопутствующих заболеваний, включая остеопороз, сексуальную дисфункцию и сосудистые заболевания, так как влияют на биохимию костной ткани, гонадальные стероиды и липидные маркеры.

Заключение.

В настоящее время применяется большое количество противоэпилептических препаратов (ПЭП) и клинических протоколов медикаментозного лечения эпилепсии, однако до сих пор для этого заболевания свойственна высокая фармакорезистентность (до 30% случаев) [256]. Кроме того, для большинства имеющихся на сегодня ПЭП характерна высокая частота тяжелых побочных эффектов [132, 356, 376], что требует разработки новых, более эффективных и менее токсичных антиконвульсантов. Поиск новых ПЭП может осуществляться в рамках разработки новых соединений, поиска новых мишеней и, учитывая высокую коморбидность, разработки мультитаргентных препаратов (121, 152, 171, 178, 207, 256, 262, 268, 342, 357, 365]. Стандарт лечения эпилепсии все еще основан на методе проб и ошибок последовательного приема различных ПЭП и отталкивается от данных особенностей эпилептической системы пациента (ЭЭГ исследования, МРТ, ПЭП), при этом не учитывает особенности воздействия препарата на структуры мозга. В связи с этим, поиск и изучение структуры-мишени для действия ПЭП является актуальным и может способствовать оптимизации лечения эпилепсии. Выявление структурных мишеней действия новых соединений позволит индивидуально подойти к лечению больных эпилепсией.

Актуальность поиска новых ПЭП обусловлена высокой фармакорезистентностью пациентов с эпилепсией, серьезными побочными эффектами у имеющихся ПЭП и тяжелой медико-социальной значимостью заболевания не только для больного и его родственников, но и для общества в целом [1]. У больных, с сохраняющимися приступами на фоне терапии стоимость лечения пропорциональна частоте и тяжести эпилептических приступов. Затраты, связанные с госпитализацией пациентов с эпилептическим статусом, в 3 раза превышают годовую стоимость лекарственной терапии, а в связи с оперативным вмешательством превышают таковую в 10-15 раз [66]. Кроме экономической составляющей, которая бременем ложиться не только на пациентов, но и на государство самыми важными аспектами остаются качество жизни пациента и его социализация, что, в том числе, объясняется молодым возрастом пациентов (у 2/3 больных эпилепсия дебютирует в детском возрасте).

Описанные выше патогенетические процессы, вовлекаемые в развитие эпилепсии, приводят к формированию так называемого эпилептогенного очага, т.е. пула нейронов с повышенной активностью. За счет диффузии глутамата и ионов калия в межклеточную среду

снижается порог возбудимости части окружающих нейронов и происходит синхронизация их возбуждения (эпилептизация). Далее возбуждение из первичного эпилептогенного очага распространяется на другие участки мозга, за счет чего формируется динамичная эпилептическая система с образованием вторичных эпилептогенных очагов, которые в свою очередь могут приобретать детерминантные свойства [92, 199, 209, 232]. В связи с вышеизложенным, возникает необходимость создания ПЭП нового поколения, лишенных побочных эффектов известных ПЭП и сочетающих противосудорожную и нейропротективную активность, что позволит не только устранять симптоматические судорожные проявления, но и остановить прогрессирование заболевания.

Гибель нейронов головного мозга в результате церебральных повреждений (травма, ишемия, инсульт), генерализованных судорог и эпилептического статуса могут проявляться тяжело отсроченными последствиями, приводя к нарушению памяти и обучения, когнитивных функций, развитию хронической эпилепсии, что может быть связано с морфологическими, метаболическими и энергетическими изменениями в мозге. Применение ПЭП (вальпроаты, бензодиазепины, карбамазепин, топирамат, ретигабин и др.) купирует повышенную судорожную активность головного мозга, тем самым предотвращая гибель нейронов от судорог, но, как правило, не обладают прямым нейропротекторным эффектом. Кроме того, предотвращающие гибели нейронов вследствие судорог (как это было показано для вальпроатов и топирамата), не оказывает влияния на дальнейшее развитие эпилепсии [113, 306]. Таким образом, учитывая коморбидность эпилепсии с когнитивными и психоэмоциональными нарушениями и совокупность патогенетических изменений, очевидно, что оправданным является поиск противосудорожных средств с ноотропным, нейропротективным, антиоксидантным, антигипоксическим и анксиолитическим действиями, повышающих устойчивость организма к стрессу, гипоксии, ишемии, воспалению, а также способных стабилизировать мембраны и затормозить развитие эпилептической системы.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

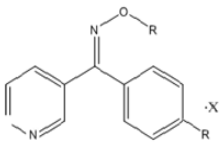
2.1 Экспериментальные животные

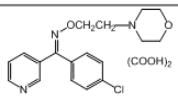
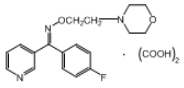
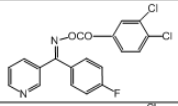
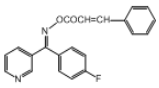
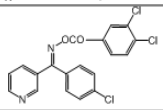
В исследовании использованы: 2762 самцов белых беспородных мышей массой 22–28 г, 560 самцах белых беспородных крыс массой 200–260 г и 100 самцах крыс линии Wistar массой 180–210 г; животные получены из питомника «Столбовая» ГУ НЦБМТ (Московская область) и Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Кроме того, в исследовании использовали 100 крыс линии Крушинского-Молодкиной, имеющих генетическую предрасположенность к аудиогенным судорогам, массой 240-280 г, которые были предоставлены из вивария биологического факультета МГУ. Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. N 51. Организацию и проведение работы осуществляли в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

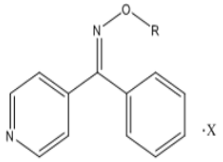
2.2 Используемые вещества

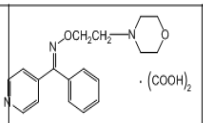
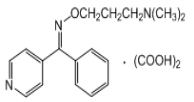
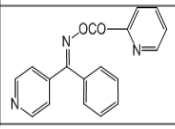
В исследовании использованы оригинальные соединения (рисунок 2): производные О-оксима 3,4,6,7,8,9-гексагидродибензо[b,d]фуран-1(2Н)-она (оксимы дибензофуранона), производные О-оксимов 3- и 4-бензоилпиридинов (оксимы бензоилпиридинов) и производные (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты (4-фенилпирролидоны), синтезированные к.х.н. Л.А. Жмуренко и к.х.н. Г.В. Мокровым в отделе химии (рук. чл.-корр. – Т.А. Гудашева) НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. В работе также использовали: коразол (пентилентетразол) (Sigma Aldrich), хлоралгидрат (Sigma Aldrich), уретан, нитрит натрия, кобальт порошковый, леветирацетам субстанция (Геофарм), вальпроевая кислота (Sigma Aldrich), топирамат (Sigma Aldrich), карбамазепин (Sigma Aldrich), Tween-80 (Sigma Aldrich), бемегрид (Sigma Aldrich), U0126 (Sigma Aldrich).

Производные О-оксимов 3- и 4-бензоилпиридина

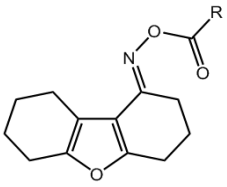


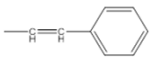
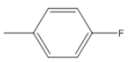
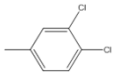
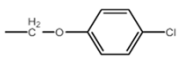
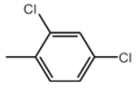
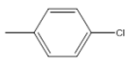
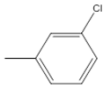
Шифр	R -	Шифр	R -
ГИЖ-301		ГИЖ-292	
ГИЖ-277		ГИЖ-275	
ГИЖ-311			



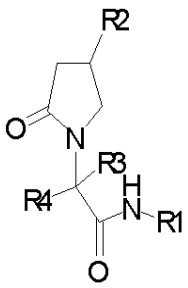
ГИЖ-298		ГИЖ-162	
ГИЖ-323			

О-бензоильные производные оксимов гексагидродибензофуранона



Шифр	R -	Шифр	R -
ГИЖ-272		ГИЖ-328	
ГИЖ-276		ГИЖ-332	
ГИЖ-310А		ГИЖ-333	
ГИЖ-327		ГИЖ-338	

Производные (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)уксусной кислоты



№ соединения	R_1	$-R_2$	$-R_3$	$-R_4$
ГИЖ-286	$-C_6H_5$-2- CH_3	4-(C_6H_5)-	-H	-H
ГИЖ-290	$-C_6H_4$-2,6- CH_3	4-(C_6H_5)-	-H	-H
ГИЖ-295	$-C_6H_5$-2- O-CH_3	4-(C_6H_5)-	-H	-H
ГИЖ-296	$-C_6H_5$-3- CF_3	4-(C_6H_5)-	-H	-H
ГИЖ-305	$-CH_2-C_6H_5$	4-(C_6H_5)-	-H	-H
Пирацетам	-H	-H	-H	-H
Фенотропил	-H	4-(C_6H_5)-	-H	-H
Леветирацетам	-H	-H	(S)* -H	$-CH_2-CH_3$

Примечание: (S)* - энантиомер.

Рисунок 2 - Структуры изученных соединений

2.3 Методы исследования противосудорожной активности

2.3.1 Тест максимального электрошока (МЭШ)

Эксперименты проводились на белых беспородных мышах массой 20–28 г. Тест максимального электрошока (МЭШ) является одной из стандартных методик, используемых для изучения первично-генерализованной эпилепсии [2]. Максимальный электросудорожный припадок (МЭШ) создавали с использованием сертифицированной установки «Rodent Shocker RS» type 221 (Harvard Apparatus, GmbH, Германия), с предварительно заданными режимом для тока: 500/300 V/mA; 144 mA, длительностью 0,3 секунды. Животные получали через корнеальные (глазные) электроды электрические стимулы. Использовался показатель – максимальная тоническая экстензия задних конечностей, которая возникает у 100 % контрольных животных. Оценивалась способность исследуемого вещества предупреждать развитие тонической экстензии и гибель при его введении внутрибрюшинно за 30 минут перед проведением МЭШ. Для определения $ЭД_{50}$ – эффективной дозы вещества, оказывающей противосудорожный эффект у 50 % животных, использовалось не менее 3-х доз вещества. Каждая доза испытывалась на 7–10 животных. Расчёт $ЭД_{50}$ производился методом пробит-анализа (метод Финни). Соединения вводили однократно, внутрибрюшинно и регистрацию эффектов осуществляли через 30 минут после введения.

2.3.2 Тест электрошока с током малой силы

Эксперименты проводили на белых б/п мышах массой 20–26 г. Использование электрошока малой интенсивности позволяет в динамике проследить развитие судорожного припадка [6]. Каждая доза соединения исследовалась на 10 животных. Животные через корнеальные (глазные) электроды получали электрические стимулы меньшей интенсивности и продолжительности (режим 250/300 V/mA: 12 mA, длительность 0,2 с или 0,3 с) в сравнении с максимальным электрошоком. Для генерации электрических импульсов использовалась сертифицированная установка «Rodent Shocker RS» type 221 (Harvard Apparatus, GmbH, Германия). При обработке результатов теста электрошока малой силы использовали балльную систему оценки выраженности судорог - от 0 до 4 баллов: 1 балл — одиночное клоническое подергивание тела мыши; 2 балла — развитие генерализованных клонических судорог с потерей рефлекса переворачивания; 3 балла — развитие клонико-тонических судорог; 4 балла – тонические судороги, заканчивающиеся гибелью животного. Подсчитывали суммарное количество баллов. Критерием эффективности соединений являлось уменьшение суммарного среднего балла и количество животных с тонической экстензией.

2.3.3 Судороги, вызванные коразолом при его подкожном введении

Эксперименты проводились на белых беспородных мышах массой 20–28 г. Каждая доза исследуемого вещества испытывалась на 8-15 животных. Коразол вводился подкожно в область шейного отдела позвоночника. В связи с высокой гигроскопичностью коразола и нестабильностью действующей дозы на первом этапе исследования определялась оптимальная доза для коразола, при которой возникали судороги, но не возникала 100 % гибель животных. Животные наблюдались в течение 60 мин после инъекции коразола. Регистрировали: латентный период (ЛП) первого клонического приступа, наличие генерализованных клонических судорог с регистрацией: 1. Генерализованные клонические судороги передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания 2. Тоническая экстензия передних конечностей с потерей рефлекса переворачивания 3. Тоническая экстензия передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания. У 90–100 % контрольных животных после введения коразола наблюдались судорожные проявления, описанные в пунктах 1-3 [6]. Соединения вводили (в/б) за 40 минут до подкожного введения коразола (95-110 мг/кг).

2.3.4 Тест пилокарпиновых судорог у мышей

Эксперименты проводили на белых половозрелых беспородных мышах-самцах, массой 24-26 г. Животные были поделены на группы. Каждая доза соединения исследовалась минимум на 8-10 животных. Исследование проводили согласно методике [4]. Вводили пилокарпин в дозах 350 и 380 мг/кг. Исследуемые соединения вводили за 40 минут до пилокарпина. Изучалась способность веществ предупреждать развитие эпилептического статуса у мышей, развивавшегося при введении пилокарпина, регистрировались латентный период развития генерализованных тонико/клонических судорог и латентный период гибели.

2.4 Электрофизиологические (ЭЭГ) исследования судорожной активности

Электрофизиологические исследования осуществляли на 21-канальном аппаратно-программном комплексе для топографического картирования электрической активности мозга «Нейросенсор-Нейро-КМ» (СТАТОКИН, Россия), работающего на базе IBM-PC Intel Core i5, с установленными фильтрами на 32 Гц, с постоянной времени (0,03 с) и записью цифровой компьютерной ЭЭГ для последующей обработки данных. Анализ электроэнцефалограммы (ЭЭГ) проводили с помощью программы «BRAINSYS», используемой метод преобразование Фурье. Программный комплекс имеет следующие функции: ввод многоканальной ЭЭГ в компьютер и ее визуальное редактирование, включая фильтрацию (использовался полосовой фильтр в диапазоне частот от 32 до 1,5 Гц), выделение артефактов и их исключение из сегментного анализа ЭЭГ; статистическая обработка результатов.

Операции по вживлению электродов проводились под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг). Индифферентный электрод, используемый при монополярной записи, помещался в носовой кости черепа. Корковые электроды изготавливались из нихромовой проволоки диаметром 120 микрон, в лаковой изоляции. Кончик электрода зачищался. В качестве подкорковых электродов использовалась нихромовая проволока диаметром 70–90 микрон. Концы электродов припаивались к серебряным штырькам, которые крепились на поверхности черепа зубным висфат-цементом протакрилом. Запись биоэлектрической активности производилась в условиях свободного передвижения животного по экспериментальной камере. Для того чтобы избежать артефактов от движения штырьков, использовались специальные пружинные контакты. Для каждого животного вычислялись следующие показатели биоэлектрической активности головного мозга: число пароксизмальных разрядов за 1 мин.; средняя длительность одного разряда за 1 мин. (в секундах).

2.5 Модели хронической эпилепсии

2.5.1 Модель фокальной хронической кобальт-индуцированной эпилепсии

Методика кобальтовой эпилепсии широко используется в экспериментальных исследованиях особенностей и механизмов действия противосудорожных веществ в России и за рубежом [7, 194, 230, 283, 361] и рекомендована «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств, ФБГУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России» [4]. Исследования проводились на самцах белых б/п крыс массой 230–260 г. Операции по вживлению долгосрочных электродов в структуры мозга крыс (в сенсомоторную зону коры левого и правого полушарий, дорзальный отдел гиппокампа, латеральные ядра гипоталамуса) осуществляли с помощью стереотаксического прибора по координатам атласа мозга крыс [2].

Эпилептогенный очаг создавался аппликацией порошка металлического кобальта на поверхность сенсомоторной области коры левого полушария мозга крыс. С этой целью в кости черепа просверливалось трепанационное отверстие, в которое вводилась стеклянная канюля с порошком кобальта (диаметр канюли соответствовал диаметру отверстия и не превышал 1 мм). Канюля опускалась на поверхность коры (твердая мозговая оболочка предварительно вскрывалась тонкой инъекционной иглой). Аппликация кобальта на кору головного мозга крысы вызывает гиперактивность нейронов, локализованных в месте введения, что выражается в появлении эпилептиформных пароксизмальных разрядов на ЭЭГ. Формирующийся эпилептогенный очаг является началом развития динамической постоянно усложняющейся структурно-функциональной системы. Функциональная организация этой системы характеризуется наличием детерминантного и зависимых очагов; детерминантный очаг усиливает и синхронизирует активность других очагов, объединяя их в единый комплекс. В

развитии эпилептической системы, вызванной аппликацией кобальта на сенсомоторную кору мозга, выделяют несколько стадий. Основными из них являются стадия формирования первичного и вторичного эпилептогенных очагов через 48 часов после операции, стадия генерализованной эпилептиформной активности (ЭпА) в различных структурах мозга со стабильным уровнем синхронизированных пароксизмальных разрядов на 6 день после аппликации кобальта (вторая стадия развития ЭпА) (рисунок 3).

Рисунок 3 – Дизайн создания кобальт-индуцированной эпилепсии

Исследуемые вещества ГИЖ-298 (60 мг/кг), ГИЖ-272 (40 мг/кг), ГИЖ-332 (30 мг/кг), ГИЖ-290 (5 мг/кг), леветирацетам (200 и 500 мг/кг) и вальпроевую кислоту (200 мг/кг) вводили внутрибрюшинно на 2 и 6 день после фоновой записи ЭЭГ, которая проводилась в течение 15 - 30 мин.

Фармакологический эффект соединений регистрировали через 1 и 2 часа после введения. Динамика эпилептической активности (ЭпА) у крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом и влияния на нее соединений регистрировалась через 48 часов после аппликации кобальта (1-я стадия) и через 6 дней (2-я стадия) развития эпилептической системы (Эпи системы). С помощью аппаратно-программного комплекса «Нейросенсор-Нейро-КМ» и программы «BRAINSYS» оценивали изменение числа и длительности разрядов в минуту в структурах мозга (ипсилатеральная кора, контрлатеральная кора, гиппокамп и гипоталамус). Дозы для изучения соединений на модели кобальтовой эпилепсии выбраны по тестам антагонизма к электрошоку и коразолу

2.5.2 Модель генетической аудиогенной эпилепсии

Крысы самцы линии Крушинского-Молодкиной (КМ), получены из лаборатории физиологии и генетики поведения (Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва).

Эксперименты проведены на половозрелых крысах самцах линии КМ в возрасте 4 месяцев со 100% появлением тонико-клонических судорог в ответ на аудиогенный раздражитель (120 Дб). Для оценки фармакологического эффекта препаратов использовались следующие количественные показатели аудиогенной реакции: латентный период (ЛП) возникновения двигательного возбуждения (ДВ) в ответ на звуковое воздействие (в сек), интенсивность судорожного припадка (в баллах от 0 до 4) и характер судорожной реакции (одно- или двухволновой). Интенсивность судорожного припадка оценивалась по следующей шкале: 0 баллов — отсутствие ДВ, 1 балл — ДВ (беспорядочный бег, прыжки, «дикий бег»), не заканчивающееся судорожным припадком, 2 балла — ДВ, заканчивающееся падением животного на брюшко с последующими клоническими судорогами, 3 балла — ДВ, заканчивающееся падением животного набок с клоническими судорогами, 4 балла — ДВ с падением животного набок с тоническим напряжением всей мускулатуры и временной остановкой дыхания.

Животные были поделены на группы случайным образом. Контрольным группам вводили физиологический раствор, опытным группам вводили соединения за 40-45 минут до тестирования в звонковой камере. Каждая группа состояла из не менее, чем 7 крыс.

2.5.3 Тест антагонизма с пилокарпином у крыс

Эксперименты проводили на белых половозрелых беспородных крысах-самцах, массой 240-260 г. Каждая доза соединения исследовалась минимум на 8 животных. Исследование проводили согласно широко используемой методике [4, 227, 241].

В эксперименте животные были случайным образом разделены на опытные группы, в т.ч. группы препаратов сравнения: 1) контроль (физ.раствор) + Пилокарпин; 2) ГИЖ-290 (5 мг/кг) + Пилокарпин; 3) Леветирацетам (600 мг/кг) + Пилокарпин; 4) Фенотропил (200 мг/кг) + Пилокарпин. Выбранные для исследуемых веществ дозировки соответствовали дозам с защитным эффектом в тесте МЭШ.

Исследуемые вещества вводили животным однократно, в/б за 40 мин до введения пилокарпина. Контрольным животным в/б вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Пилокарпин вводили крысам в/б в дозе 350 мг/кг и затем в течение 90 минут регистрировали: латентный период 1 (ЛП1) первого судорожного проявления (миоклония

головы), латентный период 2 (ЛП2) первого генерализованного судорожного приступа, число животных с генерализованным судорожным приступом и число выживших животных.

2.5.4 Тест антагонизма с пилокарпином с предварительным введением раствора хлорида лития у крыс (модель рефрактерной эпилепсии)

Предварительное введение раствора хлорида лития снижает в 10 раз порог возбудимости нервной ткани животных, что позволяло использовать пилокарпин в гораздо более низких дозах. Такое действие обусловлено химической особенностью лития, который является щелочным металлом, как и натрий, но меньшего размера. Это позволяет иону лития свободно проникать через ионные каналы нервных клеток и менять их возбудимость.

Эксперименты проводили на белых Вистар крысах-самцах, массой 180-210 г. Каждая доза соединения исследовалась минимум на 8 животных. Исследование проводили согласно методике, описанной ранее [212, 227].

В эксперименте животные были случайным образом разделены на 5 опытных групп, в т.ч. группа препарата сравнения: 1) контроль (физ.раствор) + LiCl-Пилокарпин; 2,3 и 4) ГИЖ-290 (2,5; 5 и 10 мг/кг) + LiCl-Пилокарпин; 5) Леветирацетам (600 мг/кг) + LiCl- Пилокарпин.

После предварительного введения раствора хлорида лития (127 мг/кг, в/б) животных возвращали в стандартные условия вивария. Через 18 часов крысам вводили исследуемые вещества или физраствор (контроль) и через 40 мин после этого проводили в/б инъекции пилокарпина в дозе 40 мг/кг. Наблюдение за состоянием животных проводили в течение последующих 90 минут, с регистрацией следующих показателей: латентный период 1 (ЛП1) первого судорожного проявления (миоклония головы), латентный период 2 (ЛП2) первого генерализованного судорожного приступа, число животных с генерализованным судорожным приступом и число выживших животных, а также регистрировали выживших животных через 90 мин и 24 ч после окончания опыта. Контрольным животным в/б вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме.

2.5.5 Модель эпилептического статуса

Эксперименты проводились на белых беспородных крысах-самцах массой тела 220–260 г с хронически вживленными электродами и кобальт-индуцированным эпилептогенным очагом в сенсомоторной области коры, который создавался по методике, описанной выше. Кобальт-гомоцистеиновая модель эпилептического статуса впервые была применена Walton and Treiman в 1988 г. Генерализованные судорожные припадки могут быть вызваны путем внутрибрюшинного введения D,L-гомоцистеина тиолактона (ГМЦ) крысам с корковыми поражениями кобальтом [361] с развитой стабильной эпилептической системой. При этом происходит вторичная генерализация в виде очаговых моторных припадков, что определяет

уникальность этой модели эпилептического статуса. Активация эпилептического очага происходит путем аппликации металлического кобальта в сенсомоторной области коры. После появления электрографической судорожной активности животным 7-8 день после аппликации кобальта вводится ГМЦ в дозе 5,5 ммоль/кг, разведенного в 3,5 мл/кг физиологического раствора непосредственно перед использованием (рисунок 4). Вторично генерализованные тонико-клонические судороги (ВГТКС) наблюдаются в течение 20-30 мин после инъекции ГМЦ, которые сопровождаются ЭЭГ паттернами развернутого Эпи статуса.

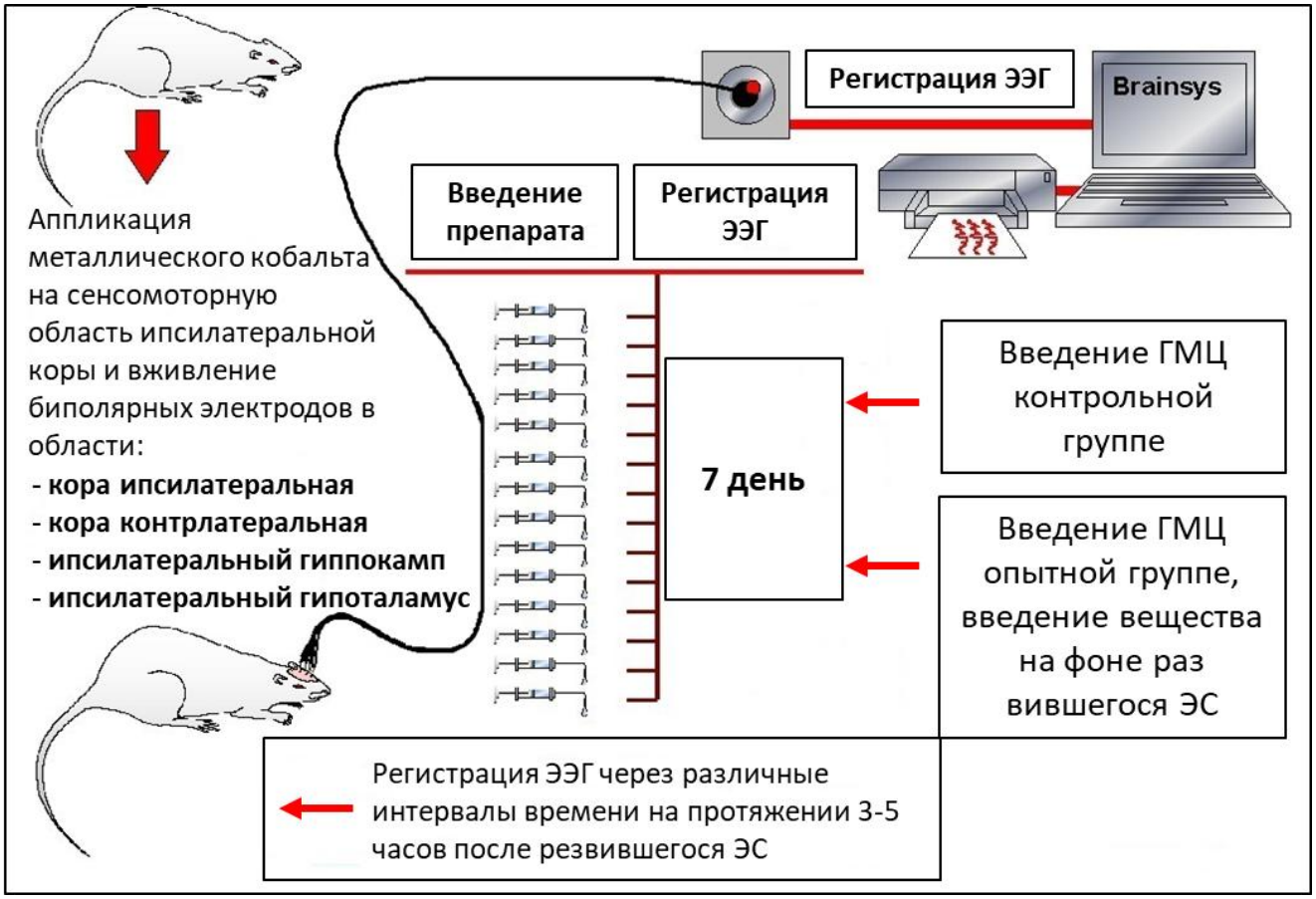


Рисунок 4 – Дизайн эксперимента в модели эпилептического статуса

Для оценки способности веществ устранять развившийся эпилептический статус, исследуемое вещество (в/б) вводили на фоне развившегося электрографического статуса, и эффект соединения регистрировали через различные интервалы после его введения с помощью аппаратно-программного комплекса «Нейросенсор-Нейро-КМ» и программы «BRAINSYS». Способность вещества устранять Эпи статус оценивали по уменьшению проявлений развернутого Эпи статуса в электрограммах различных структур мозга (ипси- и контралатеральная кора, гиппокамп и гипоталамус) и моторно-поведенческим показателям (ВКТКС), которые проявлялись в виде фокальных подергиваний, комплексных судорожных движений, «барабанный бой», боковое положение, регистрировали гибель [6].

2.5.6 Модель первично-генерализованной эпилептической активности, вызванной бемегридом

Исследование проводили на аутбредных половозрелых крысах самцах массой 220-250 г.

Исследования проводили по методике, описанной ранее [6]. Для регистрации ЭЭГ в структуры мозга крысы: сенсомоторная зона коры (кора), дорзальный отдел гиппокампа, поле CA3 (ГПК) и латеральное поле гипоталамуса (ГПТ) вживлялись долгосрочные электроды. Операции по вживлению долгосрочных электродов в структуры мозга крыс осуществляли под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг) с помощью стереотаксического прибора по координатам атласа мозга крыс [2]. Индифферентный электрод, используемый при монополярной записи, помещался в носовой кости черепа.

Эксперимент по созданию судорожной активности проводили на 4-й день после операции по вживлению электродов. Сначала у крыс в течение 15-ти минут до введения бемегрида осуществляли фоновую запись ЭЭГ структур мозга. Затем крысам вводили бемегрид в дозе 10 мг/кг (в/б) и регистрировали на протяжении 3 часов ЭпА в структурах мозга, вызванную бемегридом (контрольная группа). В опытных группах ГИЖ-290 и препарат сравнения леветирацетам вводили через 15 минут после введения бемегрида. Запись ЭЭГ после введения исследуемых веществ продолжалась в течение 1-1,5 часов. В электрограммах каждой из структур анализировали от 3 до 5-ти минутных интервалов.

Для регистрации ЭЭГ в структурах мозга использовали аппаратно-программный комплекс «Нейросенсор-Нейро-КМ». Компьютерный анализ ЭЭГ осуществлялся с помощью программы «BRAINSYS». Регистрировали следующие показатели биоэлектрической активности головного мозга: число пароксизмальных разрядов за 1 минуту и длительность одного разряда в среднем за минуту.

Группы животных: 1) Контрольная группа (бемегрид (10 мг/кг) + физ. раствор); 2) Ббемегрид (10 мг/кг) + ГИЖ-290 (2,5 мг/кг); 3) Бемегрид (10 мг/кг) + ГИЖ-290 (5 мг/кг); 4) Бемегрид (10 мг/кг) + ГИЖ-290 (10 мг/кг); 5). Бемегрид (10 мг/кг) + Леветирацетам (200 мг/кг). Каждая группа содержала не менее, чем 6 крыс.

2.6 Методики оценки неврологического дефицита и острой токсичности

Тест вращающегося стержня – Rotarod

Эксперименты проводили на белых аутбредных мышах-самцах массой 22-26 г. Для оценки нарушения координации движений и миорелаксации у мышей использовали сертифицированную установку вращающегося стержня (RotaRod, “Ugo Basile”, Италия). На горизонтальный стержень диаметром 3 см, вращающийся со скоростью 10 об./мин., помещали мышей. Подсчитывали число удержавшихся на стержне животных [6].

Тест – подтягивание на перекладине

Эксперименты проводили на белых аутбредных мышах-самцах массой 22-26 г. В тесте подтягивания на горизонтальной перекладине мышей подвешивали передними конечностями за проволоку (диаметр 0,4 см), натянутую на высоте 30 см от поверхности стола. Неспособность животных подтянуть задние конечности на проволоку регистрировали как проявление неврологического дефицита [6]. Соединения вводили однократно, в/б и регистрацию эффектов осуществляли через 40 мин после введения.

Тест оценки острой токсичности

Острая токсичность изучалась на белых б/п мышах массой 22–26 г. Животные помещались в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде и пище. Регистрация гибели животных осуществляется через 24 ч после введения веществ. Для определения $ЛД_{50}$ – дозы вещества, вызывающей гибель 50 % животных – использовалось не менее 3-х доз вещества, и каждая доза испытывалась на 6-10 животных [6]. Расчёт $ЛД_{50}$ производился методом пробит-анализа (метод Финни).

2.7 Модели церебральных повреждений

2.7.1 Модель глобальной ишемии

Перед моделированием глобальной ишемии крыс наркотизировали комбинацией хлоралгидрата в дозе 150 мг/кг и уретана в дозе 600 мг/кг внутрибрюшинно. Глубину наркотического сна проверяли по отсутствию отдергивания хвоста в ответ на сдавливание его пинцетом. Наркотизированное животное фиксировали с помощью марлевых повязок на операционном столике, располагая животом вверх. В области шеи с помощью глазных хирургических ножниц освобождали операционное поле размером 1 см х 1 см от шерсти. Затем скальпелем производили продольный разрез кожи вдоль по средней линии от нижней челюсти до лонного сочленения и, аккуратно, ватными палочками, отодвигая тимус, осуществляли доступ к двум сонным артериям до места бифуркации расположенным вдоль трахеи с обеих сторон. С помощью хирургического пинцета осуществляли захват сонной артерии с последующим отделением ее от нервов. Отделение производили анатомическим глазным пинцетом с загнутыми губками путем рассечений фасций между артерией и нервом. Затем губки пинцета заводили под артерию и, захватив лигатуру (шелковую нить длиною 10 см.) поданную с другой руки пинцетом, проводили под артерией. Процедуру выделения второй сонной артерии повторяли аналогичным способом. Кровоточивость тампонировали стерильными марлевыми салфетками. Затем обе артерии перевязывали двойным узлом или сосудистым узлом до сопротивления, избегая перерезания артерии нитью. Ложно

оперированным животным под наркозом проводили разрез кожи шеи и выделение артерий без их последующей перевязки. После перевязки сонных артерий рану обрабатывали антисептическим средством (хлоргекседин) и ушивали непрерывным швом. Животные, не вышедшие из наркоза после операции, были удалены из эксперимента. Оперированных животных с целью избегания гипотермии помещали на подогреваемую поверхность до выхода из наркоза, после чего переносили в домашние клетки [4, 67].

Модель глобальной преходящей ишемии мозга

Исследование проводили на наркотизированных (уретан 1,2 мг/кг, внутривенно) беспородных крысах-самцах массой 250-300г. Для оценки состояния микроциркуляции проводили регистрацию локального мозгового кровотока в теменной области коры головного мозга крыс с помощью лазерного допплеровского флоуметра ALF-21 фирмы “Transonic System Inc.” (США). Для этой цели игольчатый датчик флоуметра диаметром 0,8 мм устанавливали на теменной области коры головного мозга на расстоянии 6-7 мм дистальнее основания средней мозговой артерии по направлению к ее центральной ветви с помощью микроманипулятора и коромысла. Регистрацию артериального давления производили в бедренной артерии через силиконовый катетер, введение препарата осуществляли через силиконовый катетер в бедренную вену. Мозговой кровоток и уровень артериального давления регистрировали на полиграфе фирмы «BIOPAK» (США), а запись показателей производили в цифровом режиме на персональном компьютере. Данное исследование проводилось на крысах с глобальной преходящей ишемией мозга. Глобальную преходящую ишемию у крыс вызывали окклюзией с помощью зажимов обеих общих сонных артерий в течение 10 минут. Одновременно методом кровопускания снижали уровень артериального давления до 40-50 мм рт. ст. Спустя 10 минут удаляли зажимы и кровь реинфузировали [67]. Соединение ГИЖ-272 вводили внутривенно через 40-45 минут после глобальной преходящей ишемии мозга. В каждой экспериментальной группе содержалось по 10 крыс.

Электроэнцефалографический метод оценки формирования пароксизмальной активности после глобальной ишемии

Исследования проводились на самцах белых б/п крыс массой 220–260 г. Операции по вживлению долгосрочных электродов в структуры мозга крыс (в сенсомоторную зону коры левого полушария, стриатум, дорзальный отдел гиппокампа, латеральные ядра гипоталамуса) осуществляли с помощью стереотаксического прибора по координатам атласа мозга крыс [2]. Операции по вживлению электродов проводились после введения комбинации наркозных средств: хлоралгидрата (в дозе 150 мг/кг) и уретана (в дозе 600 мг/мг) по методике описанной

выше. Запись биоэлектрической активности производилась в условиях свободного передвижения животного по экспериментальной камере. Регистрация биопотенциалов мозга осуществлялась с помощью программно-аппаратного комплекса «Нейросенсор-Нейро-КМ (СТАТОКИН, Россия). Компьютерный анализ ЭЭГ осуществлялся с помощью программы «BRAINSYS».

Через неделю после вживления электродов делали «фоновую» ЭЭГ запись, моделировали ишемическое повреждение (модель глобальной ишемии) и регистрировали ЭЭГ на 1, 7, 14, 21 и 28 сутки постишемического периода (рисунок 5). Регистрировали пароксизмальную активность по появлению острых пиков и пик-волновых разрядов в электрограммах структур мозга: коре, стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе.

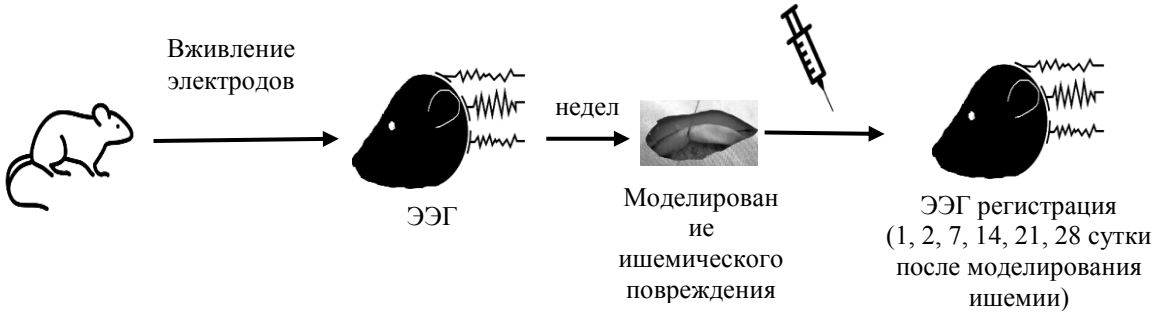


Рисунок 5 – Дизайн моделирования ишемического повреждения (ИИ)

Оценка неврологических нарушений после глобальной ишемии и посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) по шкале McGrow в модификации И.В. Ганушкиной

Неврологические нарушения у крыс после моделирования ишемического (ИИ) и геморрагического (ГИ) инсульта регистрировали на 2, 3, 7 и 14 сутки. Неврологический дефицит у животных определяли по шкале Stroke-index McGrow в модификации И.В. Ганушкиной [15, 16]. Тяжесть состояния определяли по сумме баллов. Отмечали количество животных с неврологической симптоматикой от 0,5 до 5 баллов по шкале Stroke-index: вялость, замедленность движений (0,5), слабость конечностей (1), односторонний полуптоз (1), двусторонний полуптоз (1,5), односторонний птоз (1,5), двусторонний птоз (1,5), манежные движения (2), парез 1–4 конечностей (2,0–5,0), паралич 1–4 конечностей (3,0–6,0), коматозное состояние (7). Птозы и полуптозы оценивали визуально по степени опущености века: полуптоз - опущение века на половину глаза, птоз — опущение века полностью. Манежные движения оценивали визуально по круговым движениям вокруг своей оси или по периметру круглого открытого поля. Слабость конечностей оценивали в тесте «Перекладина» по способности животных удерживаться на горизонтальной перекладине. Парезы конечностей оценивали

визуально в открытом поле и в тесте Рота Род. При парезе конечностей визуализируется отклонение походки животного от нормы (норма - ложно оперированная группа крыс), а в тесте Рота Род регистрировали нарушения координации движений на вращающемся стержне. Параличи конечностей определяли по потере глубокой и поверхностной чувствительности. Поверхностную чувствительность оценивали тонким острым предметом (иглой), глубокую при сдавливании лапы пальцами или корнцангом.

Методика оценки моторных функций и координации движений в тесте «РотаРод» у крыс

Для исследования моторного дефицита и нарушения координации движений у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом использовали методику вращающегося стержня, Rota Rod (Ugo Basile, Италия). Регистрацию поведения проводили на 1, 7 и 14 сутки после ИИ и ГИ: отмечали количество падений за 2 минуты, скорость барабана при которой животное падало и латентный период (ЛП) падения. На 2 день после ИИ и ГИ на горизонтальный стержень диаметром 4 см, вращающийся со скоростью 10 об/мин, помещали крыс. Неспособность животных удерживать равновесие на стержне в течение 2 минут рассматривали как проявление нарушения координации движений и развития моторного дефицита. На 7 и 14 дни крыс сажали на вращающийся барабан с меняющейся скоростью от 10 до 30 об/мин (ускорение 4 об/мин). Регистрировали ЛП падения и скорость барабана при падении [6].

Оценка когнитивных нарушений в модели Y-образного лабиринта

Тест пространственного исследования в Y-образном лабиринте (Y-maze test, OpenScience, Россия) проводили в течение 2-х дней согласно протоколу [225]. Тестирование в Y-образном лабиринте позволяет оценить мотивацию животных к исследованию новых объектов – нового рукава, который не был исследован в ходе предыдущего исследования. Y-лабиринт выполнен из непрозрачного материала, в котором все три рукава одинаковые и сходятся в центре под углом 120 градусов. В 1-й день эксперимента один из рукавов закрывали непрозрачной заслонкой. Животное помещали в один из открытых рукавов лабиринта (и называли его «домашний» рукав) и в течение 5 мин позволяли животному свободно посещать два открытых рукава («домашний» и «альтернативный»). Через 24 часа животное вновь помещали в «домашний» рукав, но при этом открывали все 3 рукава установки («домашний» (A), «альтернативный» (B) и «новый» (C)). Регистрировали время пребывания в каждом рукаве и общее число их посещений в течение 5 минут. Критерием оценки эффективности соединений на когнитивные функции было время, проведенное животными в «новом», ранее не исследованном рукаве «С». Тестирование в Y-образном лабиринте крыс проводили на 6-е сутки после создания ИИ или ГИ.

2.7.2 Моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы, геморрагического инсульта

Исследования проводились на самцах белых б/п крыс самцов массой 220–300 г. Перед моделированием интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ), геморрагического инсульта (ГИ) крыс наркотизировали комбинацией хлоралгидрата в дозе 150 мг/кг и уретана в дозе 600 мг/кг внутрибрюшинно. Глубину наркотического сна проверяли по отсутствию отдергивания хвоста в ответ на сдавливание его пинцетом. Моделирование ГИ проводили в области внутренней капсулы правого полушария [64, 67] по методике, разработанной А.Н. Макаренко [64].

У наркотизированных и зафиксированных на операционном столике животных с помощью ножниц выстригали шерсть на голове площадью 1,5х1,0 см. между ушами и делали разрез кожи скальпелем. С помощью расширителя раны отодвигали кожу с последующим освобождением операционного поля от фасций. Затем шпателем зачищали кость черепа до четкой визуализации пересечения сигмы с брегмой, необходимой для определения координат по атласу. Затем крыс переносили и фиксировали в стереотаксическом комплексе. Голова животного закреплялась в стереотаксисе с помощью ушных и зубных держателей. Голова животного устанавливалась в соответствии с требованиями стереотаксического атласа (голову крысы устанавливают так, чтобы уровень брегмы (пересечение сагиттального и коронарного шва) был на 1 мм выше уровня лямбды (пересечение сагиттального и затылочного шва). При помощи бормашины в стереотаксисе осуществляли трепанацию черепа в области capsula interna по координатам атласа Буреша для аутбредных крыс - L=3,5 мм, A=1,5 мм. Потом прокалывали твердую мозговую оболочку с помощью заточенной иглы-канюли и погружали ее с помощью стереотаксического прибора до требуемой глубины. При помощи специального устройства (мандрен-нож) осуществляли деструкцию мозговой ткани на глубине H=4,5 мм с последующим введением в место повреждения крови, взятой из-под языка оперируемого животного в объеме 0,02-0,03 мл. При деструкции мозговой ткани мандрен-нож поворачивали по и против часовой стрелки по 3 раза. Игла мандрен-ножа была загнута под углом 20 градусов, с помощью чего достигалось иссечение проводящих путей во внутренней капсуле. Ложно оперированным животным проводили скальпирование и трепанацию черепа, избегая повреждения мозговой оболочки. После обработки антисептиком (хлоргексидин) производили ушивание раны непрерывным способом режущей хирургической иглой с полипропиленовой нитью. Шов обрабатывали бриллиантовым зеленым. Оперированных животных с целью избегания гипотермии помещали на подогреваемую поверхность до выхода из наркоза, после чего переносили в домашние клетки.

2.8 Методики изучения противогипоксической активности

2.8.1 Тест нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме

Эксперименты проводились на белых беспородных мышах массой 22–26 г. Животных помещали в банку объемом 250 мл, плотно закрытую крышкой, герметично зафиксированную парафиновой пленкой. Регистрировали продолжительность жизни животных с помощью секундомера до агонального вздоха. Нормобарическая гипоксия развивается при нормальном общем барометрическом давлении, но сниженном парциальном давлении кислорода во вдыхаемом воздухе. На фоне острой недостаточности кислорода животное в опыте гибнет. Увеличение длительности жизни животного по сравнению с контрольной группой, которой вводили физиологический раствор, считается положительной оценкой антигипоксического действия изучаемого вещества [4]. Соединения вводили однократно в/б за 40 минут до теста.

2.8.2 Тест гемической гипоксии

Эксперименты проводились на белых беспородных мышах массой 22–26 г. Нитрит натрия вводился подкожно в область шейного отдела позвоночника в дозе 170 мг/кг. Регистрировали продолжительность жизни животных с помощью секундомера до агонального вздоха. В основе острой гемической гипоксии лежит уменьшение кислородной емкости крови. Критерием антигипоксического эффекта соединений было увеличение длительности жизни животных [4]. Все соединения вводили однократно в/б за 40 минут до теста.

2.9 Методы оценки нейропсихотропной активности

2.9.1 Тест приподнятого крестообразного лабиринта

Установка приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) состояла из крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом 4-х рукавов: два противоположных, открытых, без стенок, и два закрытых, темных. Центральная площадка и пол открытых рукавов прозрачны, а пол и стенки закрытых рукавов покрашены в темный цвет. Эксперименты проводили при дневном освещении. Размеры ПКЛ рукава составляли 5×5×30 см, центральная площадка — 5×5×5 см, ПКЛ приподнят на 30 см от пола. Непосредственно перед началом эксперимента животных выдерживали (от 3 до 5 мин) в темных клетках. Затем животное помещали в ПКЛ на центральную площадку, головой к открытому рукаву и в течение 5 мин регистрировали время пребывания животных в открытых, закрытых рукавах, а также на центральной площадке, количество заходов в открытые и закрытые рукава, латентный период выхода из центральной площадки. Контрольные интактные животные предпочитают большую часть времени проводить в закрытых, темных рукавах. Анксиолитический эффект соединений оценивали по увеличению числа заходов в светлые рукава и времени нахождения в них, без

увеличения общего числа заходов. Время нахождения на центральной площадке позволяет оценить показатель принятия решения. По общему числу заходов в открытые и закрытые рукава можно оценить общую двигательную активность.

В экспериментах для оценки влияния соединения ГИЖ-298, соединения ГИЖ-290, леветирацетама, вальпроевой кислоты на тревогу животных использовались белые беспородные мыши самцы массой 22-24 г. Животных делили на группы по 8-10 мышей в каждой. Все соединения и препараты сравнения вводили однократно за 40 минут до начала эксперимента.

2.9.2 Тест спонтанного чередования в Y-образном лабиринте

В опыте использовались белые беспородные мыши самцы массой 22-24 г. Животных делили на группы по 10 мышей в каждой. ГИЖ-290, ГИЖ-298, леветирацетам и вальпроевую кислоту вводили однократно за 40 минут до начала эксперимента.

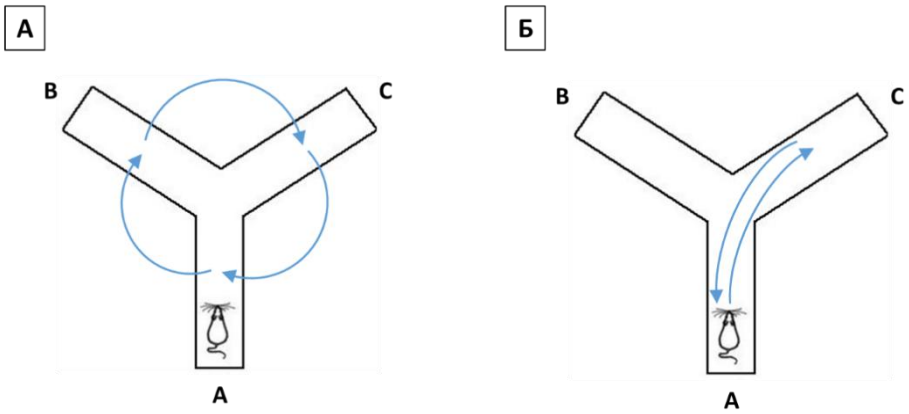
Изучение влияния на когнитивные функции по оценке кратковременной (рабочей) памяти у мышей проводили в тесте Y-образного лабиринта. Спонтанное чередование Y-образном лабиринте - поведенческий тест для измерения готовности грызунов к изучению новых условий [235]. Грызуны обычно предпочитают исследовать новый рукав лабиринта, а не возвращаться в тот, который был ранее посещен. Многие части мозга, задействованные в когнитивные процессы (гиппокамп, перегородка, базальный ядра, префронтальная кора), вовлечены в эту задачу. Тест используется для количественной оценки когнитивного дефицита у мышей и оценки влияния фармакологических веществ на когнитивные функции.

Тест выполнен в соответствии с протоколом лаборатории поведенческой и функциональной неврологии медицинского факультета Стэнфордского Университета [333].

Испытания проводятся в Y-образном лабиринте с тремя белыми непрозрачными пластиковыми рукавами (40 х 8 х 15 см), расположенными друг от друга под углом 120° и обозначаемым как А, Б, С. После помещения в центр лабиринта животному разрешено свободно исследовать три рукава. В течение трех последовательных заходов мышь должна проявлять склонность заходить в ранее непосещаемый коридор. Животному предоставляли возможность посетить 12 рукавов, после чего проба считалась законченной. Затем определяли количество “адекватных” триад, состоящих из заходов в каждый рукав лабиринта без повтора (АБС, БСА, САБ, БАС, АСБ, СБА и т.д.). Определяли % чередования, который был равен отношению числа “адекватных” триад к общему количеству посещений.

Животное с хорошей памятью будет помнить рукава лабиринта, которые оно посещало ранее и переходить в менее посещаемый рукав (рисунок 6 А). Наоборот нарушение рабочей

памяти будет приводить к пребыванию в ранее посещенном рукаве и соответственно низкому проценту правильных чередований (рисунок 6 Б).



Примечание - (А) - правильное чередование; (Б) - неправильное чередование.

Рисунок 6 - Перемещение животного по Y-лабиринту

2.9.3 Тест водного лабиринта Морриса

Оригинальная модель эксперимента была предложена Моррисом в 1984 г [271]. В данном эксперименте была использована модель теста в модификации Vorhees et Williams (2006) [360] для изучения процессов обучения и пространственной памяти у животных. Лабиринт Морриса широко используется в исследованиях, связанных с изучением механизмов пространственной ориентации и памяти и выявлением путей фармакологического воздействия на них. Режим с предварительным ознакомлением применяется, когда в задачу исследования входит выявление роли той или иной медиаторной системы (в частности, холинергической) в реализации эффекта изучаемого вещества. При введении на этом фоне исследуемого вещества можно выявить нормализующий эффект вещества и таким образом установить роль данной медиаторной системы в реализации эффекта изучаемого соединения и его антиамнестический эффект.

Был использован бассейн диаметром 150 см (модель TS1004-M2, OpenScience). Эксперименты проводили на аутбредных мышах-самцах. Бассейн наполняли водой комнатной температуры ($24+2^0$C), забеленной молоком. Бассейн делился на 4 сектора, обозначенных символами и в одном и том же секторе (называемом «целевым») помещалась платформа диаметром 5 см.

В первый день до начала основной фазы эксперимента проводили отбор животных, пригодных для обучения. Для этого платформу располагали на 0,5 см выше уровня воды. Мышь помещали на платформу на 20 секунд. Затем мышь опускали в воду на противоположной стороне бассейна и позволяли в течение 60 секунд найти платформу и

взобраться на нее, где оставляли животное на 20 секунд. Процесс повторяли, опуская мышь в воду с другой, отличной от первой попытки, стороны бассейна. Если животное было не в состоянии самостоятельно найти платформу в течение 60 секунд, экспериментатор помогал ему переместиться к платформе и взобраться на нее. Если животное не могло самостоятельно найти платформу в двух попытках подряд, его исключали из опыта.

Перед 1-ым днем основного опыта животные были разделены случайным образом на 4 опытных группы + 1 группа контроля: 1) контроль (физ.раствор); 2) ГИЖ-290 (2,5 мг/кг, в/б); 3) ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б); 4) Леветирацетам (600 мг/кг, в/б); 5) Пирацетам (400 мг/кг, в/б).

В последующие дни перед опытом животным один раз в сутки вводили в/б физиологический раствор (контрольная группа — NaCl, 0,9%), либо однократно растворы опытных веществ.

В течение 2-х последующих дней платформу располагали на 0,5 см ниже уровня воды и предоставляли животным по 4 попытки для поиска платформы в течение 60 секунд. Интервал между попытками составлял 20 секунд, в течение которого мыши находились на платформе. Каждый день перед первой попыткой животное на 20 секунд помещали на платформу. Регистрировали время, прошедшее от момента спуска животного в воду до залезания на платформу. Животных помещали в воду в 3-х различных точках на половине бассейна, противоположной по отношению к платформе.

Через 48 часов после второго дня обучения (на 5-ый день опыта) оценивали воспроизведение пространственного навыка: платформу убирали, и животных однократно помещали в бассейн на 60 секунд. Регистрировали латентное время нахождения платформы и время, в течение которого животное находилось в квадранте, где в дни обучения располагалась платформа, что служило показателем эффективности обучения и воспроизведения пространственного навыка.

2.9.4 Тест «Вынужденное плавание по Порсолту»

Оценку влияния соединений на антидепрессивную активность проводили в тесте «Вынужденное плавание по Порсолту» [295, 296]. Установка для проведения теста у мышей представляет собой сосуд в виде цилиндра, выполненного из прозрачного акрилового пластика (оргстекла), диаметром 20 см и высотой 45 см, заполненного водой (температура 22–25 °С). В период теста мышь помещают в воду на 6 минут и регистрируют продолжительность неподвижного зависание в воде – стадия иммобильности, или «зависания», – так называемое поведение “отчаяния” (беспомощности) считающегося мерой депрессивноподобного состояния, и время активного плавания мышей, а также латентное время первого эпизода иммобильности.

2.10 Нейрохимические методы исследования

2.10.1. Метод радиорецепторного связывания с ГАМКА-, ГАМКВ-, NMDA-, mGluII- и D2 - рецепторами мозга

Выделение плазматических мембран с ГАМК$_A$-рецепторами мозга. Приготовление мембранных препаратов, содержащих ГАМК$_A$-рецепторы коры мозга крыс, проводили по модифицированным методам [193]. В день эксперимента образцы фронтальной коры размельчали в гомогенизаторе Поттера «тефлон-стекло» в 20 объемах ледяного буфера (0.32 М Сахароза; pH 7.1). Гомогенат центрифугировали в ультрацентрифуге «Optima L-70K» («Beckman Coulter») в течение 10 минут при 1000 g. Супернатант повторно центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл холодной дистиллированной воды и центрифугировали 8000 g 20 мин. Супернатант и желтый надосадочный слой повторно центрифугировали при 48000 g 20 мин. Осадок суспендировали в 0.05 М Tris-citrate буфере (pH 7.1) и центрифугировали 48000 g 20 мин. Полученную мембранную фракцию замораживали и хранили при -80^{0}С. В день эксперимента мембраны суспендировали в 40 объемах 0.05 М Tris-citrate буфера (pH 7.1) и центрифугировали при 48000 g 20 мин. Полученный осадок суспендировали в 40 объемах 0.05 М Tris-citrate буфера (pH 7.1), инкубировали при 24^{0}С в течение 30 мин и снова центрифугировали при 48000 g 20 мин. Конечный осадок ресуспендировали в свежем буфере.

Выделение плазматических мембран с ГАМК$_B$-рецепторами мозга. Для приготовления мембран, содержащих ГАМК$_B$-рецепторы коры мозга крыс, использовали методы [67, 197] в модификации. В день эксперимента фронтальную кору размельчали в гомогенизаторе Поттера «тефлон-стекло» в 10 объемах ледяного буфера (0.32 М Сахароза; pH 7.4). Образовавшийся гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин. Супернатант повторно центрифугировали при 20000 g 20 мин. Затем полученный осадок ресуспендировали в дистиллированной воде и вновь центрифугировали 20 мин при 8000 g.Образовавшийся супернатант и верхний надосадочный слой центрифугировали 20 мин при 48000 g, а осадок суспендировали и вновь центрифугировали в 50 мМ Tris-Citrate буфере (pH 7.4) 2 раза по 20 мин. при 48000 g, после чего замораживали при -80^{0}С. В день эксперимента мембраны размораживали при комнатной температуре и ресуспендировали в 20 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, 2.5 мМ$CaCl_2$, pH 7.4), затем центрифугировали при 8000 g 20 мин. Полученный осадок суспендировали в 20 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, 2.5 мМ$CaCl_2$, pH 7.4) и центрифугировали при 20000 g 20 мин, последнюю процедуру повторяли ещё один раз. Конечный осадок ресуспендировали в свежем буфере.

Выделение плазматических мембран с NMDA-рецепторами мозга. Выделение плазматических мембран гиппокампа проводили по модифицированным методам [237]. В день

эксперимента гиппокампы размельчали в гомогенизаторе Поттера «тефлон-стекло» в 10 объемах буфера №1 (5 mM HEPES, 4.5 mMTris, 0.32 M Сахароза, pH 7.6). Гомогенат разбавляли 50 объемами буфера №2 (5 mM HEPES, 4.5 mMTris, pH 7.6) и центрифугировали при 1000g 10 минут на ультрацентрифуге «Optima L-70K» (Beckman Coulter). Супернатант сливали и вновь центрифугировали при 25000g 20 мин. Для увеличения выхода белка эту операцию проводили дважды. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера №2 и центрифугировали при 8000g 20 мин. Супернатант и верхний коричневый осадочный слой сливали и центрифугировали при 25000g 20 мин. Осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера №3 (5 mM HEPES, 4.5 mMTris, 1 mMNa_4EDTA, pH 7.6) и троекратно центрифугировали при 25000g 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера №2 и однократно центрифугировали при 25000g 20 мин. Конечный осадок сохраняли в 5 объёмах буфера №2 и замораживали в криопробирках в жидком азоте. В день анализа ткань размораживали, разбавляли в 10 объёмах буфера №2, центрифугировали при 25000g 20 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера №2. Концентрация белка в образцах мембран составляла 2-3 мг/мл.

Выделение плазматических мембран с mGluR мозга. Выделение мембран с mGluR проводили по методу [319]. В день эксперимента ткань мозга измельчали в гомогенизаторе Поттера «тефлон-стекло» в 25 объемах буфера (50 mM Tris-HCl, pH 7.1). Гомогенат центрифугировали при 48000 g 10 мин. Полученный осадок ресуспендировали в буфере (50 mM Tris-HCl, pH=7.1) и инкубировали при 37^0C 10 минут, затем центрифугировали при 48000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в 5 объёмах буфера и замораживали в криопробирках при -80^0C. В день эксперимента мембраны размораживали и центрифугировали 3 раза в буфере (50 mM Tris-HCl, 2 mM $MgCl_2$, pH=7.4) 48000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера (50 mM Tris-HCl, 2 mM $MgCl_2$, pH=7.4). Концентрация белка в образцах мембран составляла 0.25 мг/мл.

Выделение плазматических мембран с D_2-рецепторами коры мозга и стриатума. В экспериментах по радиолигандному анализу D_2-рецепторов использовали метод, описанный в литературных данных [340]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в холодильнике при температуре -80°C. В день эксперимента фронтальную кору больших полушарий мозга и стриатумы гомогенизировали в 10 объемах ледяного буфера (HEPES, 50 мМ; NaCl, 118 мМ; CaCl2, 2,5 мМ; KCl, 4,8 мМ; MgSO4, 1,2 мМ; pH=7,4) в гомогенизаторе «стекло-тефлон». Гомогенат центрифугировали в ультрацентрифуге «Optima L-70K» (Beckman Coulter) в течение 30 минут при 17500 g. Полученный осадок суспендировали в 20 объемах холодной дистиллированной воды и оставляли для гидролиза на час. Взвесь центрифугировали 30 минут при 17500 g. Полученный осадок ресуспендировали в буфере и

повторно обрабатывали в том же режиме. Итоговый осадок суспендировали в буфере до конечной концентрации 4-6 мг исходной ткани на 1 мл буфера.

Радиолигандный метод оценки рецепторного связывания. В экспериментах по радиолигандному связыванию использовали [^{3}H]Ketanserin (для 5-HT_{2A}-рецепторов) с удельной активностью 60 Кюри/ммоль, [^{3}H]МК-801(+) (для NMDA-рецепторов) с удельной активностью 210 Кюри/ммоль, [^{3}H]LY354740 (для mGluII-рецепторов) с удельной активностью 42 Кюри/ммоль, [^{3}H]Sulpiride(-) (для D_2-рецепторов) с удельной активностью более 40 Кюри/ммоль. Инкубационная смесь (конечный объем 0,5 мл) содержала 50 мкл меченого лиганда, 250 мкл буфера и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда (1 mM). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (для 5-HT_{2A}- и NMDA-рецепторов), при комнатной температуре в течение 1 часа (для mGluII- и D_2-рецепторов). По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C (Whatman), предварительно смоченные в 0.3% полиэтиленимине в течение 2 часов при комнатной температуре. Каждую пробирку промывали два раза холодным буфером, затем фильтры промывали два раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы. Фильтры заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г PPO, 0.2 г POPOP на 1 л толуола).

Обработка и представление результатов. Результаты экспериментов *ex vivo* оценивали с помощью рассчитанных величин K_d и B_{max}, отражающих степень сродства рецептора к лиганду (нМ) и количество мест связывания лиганда (фмоль/мг белка), соответственно. Для анализа насыщения и получения характеристик связывания Bmax и Kd измеряли специфическое связывание для NMDA рецепторов в диапазоне концентраций от 0,5 до 20 нМ, для mGluII рецепторов – от 12,5 до 200 нМ, для 5-HT_{2A}-рецепторов – от 1,25 до 20 нМ, для D_2-рецепторов – от 1,25 до 40 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Для построения кривых насыщения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 2-х повторностях.

Радиоактивность определяли на счетчике Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer) с эффективностью счета 42-46%. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури (1951). Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программы GraphPad Prism 8 и Statistica 6.0. GraphPad Prism 8 содержит стандартные алгоритмы обсчета полученных данных по использованным вариациям байдинга. Оценку рассчитанных коэффициентов регрессии и корреляции проводили с помощью t-критерия Стьюдента и доверительных интервалов. Результаты представлены в виде «mean±S.E.M».

Дизайн оценки рецепторного связывания у животных в условиях максимального электрошока (МЭШ)

В *1 серии* определяли характеристики связывания с 5-HT_{2A}-, NMDA- и mGluII-рецепторами в структурах мозга крыс после однократного (1дн) нанесения максимального электрошока (МЭШ) и введения ГИЖ-298. ГИЖ-298 вводили в дозе 60 мг/кг (в/б) за 40 минут до проведения теста МЭШ. Через 5 минут крыс декапитировали и извлекали на льду префронтальную кору, гиппокамп и стриатум. Структуры замораживали в жидком азоте и взвешивали. Крысы были разделены случайным образом на 4 экспериментальные группы: 1) Интактный контроль, получали физиологический раствор 1дн, n=8; 2) ГИЖ-298 без МЭШ (60 мг/кг/1дн / в/б), n=8; 3) контроль МЭШ 1дн, получали физиологический раствор 1дн, n=8; 4) МЭШ 1дн+ ГИЖ-298 (60 мг/кг/1дн/ в/б), n=11.

Во *2 серии* опытов определяли характеристики связывания D_2-рецепторов в структурах мозга мышей после 5-кратного (5 дн) нанесения МЭШ и введения ГИЖ-298. ГИЖ-298 вводили в дозе 60 мг/кг (в/б) в течение 5 дней за 40 минут до проведения теста МЭШ. Через 5 минут мышей декапитировали и извлекали на льду префронтальную кору и стриатум, которые замораживали в жидком азоте и взвешивали. Мыши были разделены случайным образом на следующие экспериментальные группы: 1) Интактный контроль, получали физиологический раствор 5 дн, n=8; 2) ГИЖ-298 (60 мг/кг/5дн / в/б), n=8; 3) контроль МЭШ 5 дн, получали физиологический раствор 5дн, n=14; 4) МЭШ 5дн + ГИЖ-298 (60 мг/кг/5дн/ в/б), n=8.

Дизайн оценки рецепторного связывания у животных в условиях литий-пилокарпиновых судорог

Эксперименты проводили на крысах-самцах Вистар, массой 220-250 г. Согласно принятому протоколу, описанному выше, животным вводили водный раствор хлорида лития – 127 мг/кг (в/б), а через 18 часов - пилокарпин (в/б) в дозе 40 мг/кг. В результате у 97-100% животных развивается эпилептический статус и гибель. Леветирацетам и ГИЖ-290 вводили в/б за 40 мин до введения пилокарпина.

Животные были случайным образом разделены на 6 групп по 7 особей в каждой: 1).контроль (физ. раствор); 2). Леветирацетам (600 мг/кг, в/б); 3). ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б); 4).LiCl-пилокарпин + физ. раствор; 5). LiCl-пилокарпин + леветирацетам (600 мг/кг, в/б); 6). LiCl-пилокарпин + ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б).

Декапитацию крыс проводили через 40 мин после последних инъекций, фронтальную кору и гиппокампы извлекали на льду, быстро замораживали в жидком азоте и сохраняли в криопробирках при -80°C для проведения радиолигандного и хроматографического анализа.

2.10.2 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией (ВЭЖХ/ЭД)

Определение уровней нейрональных аминокислот в структурах мозга животных

Исследование влияния ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты на содержание нейрональных аминокислот проводили в условиях теста МЭШ. Опыты проведены на беспородных мышах-самцах массой тела 22–24 г. Животных декапитировали через 5 минут после предъявления МЭШ. В каждой группе животных содержалось по 8-10 мышей: контроль с МЭШ (физ. р-р), контроль без МЭШ (физ. р-р), МЭШ+ГИЖ-298 (60 мг/кг), МЭШ+ВК (200 мг/кг).

Исследование влияния ГИЖ-290 и леветирацетама на содержание нейрональных аминокислот проводили в условиях теста литий-пилокарпиновых судорог. Опыты проведены на крысах самцах Вистар, массой тела 220–250 г. Животные были случайным образом разделены на 6 групп по 7 особей в каждой: 1).контроль (физ. р-р); 2). Леветирацетам (600 мг/кг, в/б); 3). ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б); 4).LiCl-пилокарпин + физ. р-р; 5). LiCl-пилокарпин + леветирацетам (600 мг/кг, в/б); 6). LiCl-пилокарпин + ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б).

Определение содержания тормозных (ГАМК, глицин, таурин) и возбуждающих (аспартат, глутамат) нейромедиаторных аминокислот в экстрактах ткани мозга проводили методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией согласно модифицированной методике [288]. Поскольку исследуемые аминокислоты в нативной форме являются очень слабыми хромофорами (не флюоресцируют и не поглощаются в UV области), для устойчивой детекции они были предварительно дериватизирована ортофталевым диальдегидом (ОФА), который обладает флуоресцентными свойствами и, вступая в реакцию с аминокислотой, образует флуоресцирующий комплекс. Для деривации аминокислот к 25 мкл супернатанта добавляли 25 мкл 0,1М боратного буфера и 10 мкл о-фтальальдегид-сульфитного реактива в 0,1М боратном буфере (pH 9,5). ГАМК, аспартат, глутамат, таурин, глицин в начальной концентрации 0,1 мкМ в 0,1 н $HClO_4$ использовали в качестве стандартной смеси для калибровки.

Через 20 мин после инкубации при комнатной температуре. 20 мкл реакционной смеси наносили на колонку Hypersil ODS 5 mkM, 4,6*250. Регистрацию продуктов разделения проводили на флюоресцентном детекторе Agilent 1100, США, при длине волны возбуждения 230 нм и длине волны эмиссии 392 нм. Подвижная фаза для определения нейромедиаторных аминокислот состояла из 0,06 М $NaH_2PO_4*H_2O$, 0,0032 М Na_2HPO_4, 0,025 mM ЭДТА, и 1,24 mM CH_3OH, pH=5,6. Скорость подвижной фазы составляла 1.5 мл/мин. Тканевое содержание аминокислот выражали в мкмоль/мг сырой ткани.

Определение уровней моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс после МЭШ

Исследование влияния ГИЖ-298 и топирамата на содержание моноаминов проводили в условиях теста МЭШ. Опыты проведены на беспородных крысах-самцах массой тела 220–240 г. Животных декапитировали через 5 минут после предъявления МЭШ. В каждой группе животных содержалось по 8-10 крыс: контроль с МЭШ (физ. р-р), контроль без МЭШ (физ. р-р), МЭШ+ГИЖ-298 (60 мг/кг), МЭШ+топирамат (200 мг/кг).

Животных декапитировали через 5 мин после теста максимального электрошока (МЭШ), после чего структуры мозга (фронтальная кора (ФК), гипоталамус, стриатум и гиппокамп) извлекались на льду, замораживались в жидком азоте и взвешивались. Перед экспериментами по определению содержания нейротрансмиттеров пробы размельчали в гомогенизаторе Поттера (тефлон-стекло) в 1 мл 0,1 н $HClO_4$ с добавлением 3,4-диоксибензиламина (0,5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин. Супернатант использовали для определения моноаминов и их метаболитов: НА (норадреналин), ДА (дофамин), ДОФУК (3,4-диокси(гидрокси)фенилуксусная кислота), ГВК (гомованилиновая кислота), 3-МТ (3-метилтирамин), 5-ОТ (серотонин), 5-ОИУК (5-окси(гидрокси)индолуксусная кислота). Содержание моноаминов и их метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, США) с аналитической колонкой ReproSil-Pur ODS (C18, 100х4 мм, 3 мкм) (Dr.Maisch, Германия), при скорости элюции подвижной фазы 1,0 мл/мин и давлении до 200 атм. Мобильная фаза состояла из: 0.1 М цитратно-фосфатного буфера, содержащего 1.1 mM октансульфоновой кислоты, 0.1 mM ЭДТА и 9% ацетонитрила (pH 3.0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4B (BAS США) на двойном стеклоугольном электроде (+0.85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Регистрация образцов проводилась с применением аппаратно-програмного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1,5 («Амперсенд»). Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о.с.ч. или analytical grade.

2.10.3 Изучение активности ERK 1/2 киназ и синапсина I

В исследовании использовали беспородных мышей-самцов, массой 22-25 г. Исследования проводили в условиях судорог, вызванных МЭШ в течение 5 дней. Животных декапитировали через 5 минут после последнего предъявления МЭШ и извлекали стриатум.

Животные были случайным образом разделены на 6 групп: 1) Контрольная группа (физ. р-р, n = 23); 2) Группа ГИЖ-298 (в дозе 60 мг/кг/5 дней в/б, n = 16); 3) Группа ВК (в дозе 200 мг/кг/5 дней в/б, n = 12); 4) Группа МЭШ, n = 16; 5) Группа, подвергшаяся МЭШ с введением

ГИЖ-298 (в дозе 60 мг/кг/ 5 дней в/б, n = 20); 6) Группа, подвергшаяся МЭШ, получавшая ВК (в дозе 200 мг/кг/ 5 дней в/б, n = 9).

Клеточные культуры. Клетки (нейробластомы человека SH-SY5Y) высеивали в культуральные чашки диаметром 90 мм (Nunc, Roskilde, Дания) при плотности 0,5 × 106 клеток/чашку и выращивали во влажной атмосфере при 37°C, 5% CO2 в среде RPMI с добавлением 10% (об./об.)) инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (HyClone), 2 мМ L-глютамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, а затем удаляли с помощью трипсина/ЭДТА. В экспериментах, в которых на клетки воздействовали ингибитором МЕК U0126, Гиж-298 и вальпроевой кислотой, соединения растворяли в ДМСО и добавляли к культурам за 48 ч до лизиса клеток. В чашки с контрольными клеками добавляли эквивалентный объем ДМСО. После экспозиции клетки промывали 3 раза раствором Версена (Invitrogen) и затем удаляли из чашек интенсивным пипетированием раствором Версена без использования трипсина. Для всех экспериментов было получено пять независимых повторов.

Иммуноблотинг (вестерн-блот анализ). Экстракты общего белка ткани полосатого тела готовили с использованием набора для экстракции протеина ReadyPrep (TotalProtein), BioRad, в соответствии с рекомендациями производителя. После этого образцы белков гомогенизировали в буфере SDS-PAGE (65 мМ Трис-HCl pH 6,8, 10 % глицерина, 2 % SDS, 1 % ДТТ, 0,01 % бромфенолового синего) при 5-минутном нагревании до 100°C. Собранные осадки клеток SH-SY5Y гомогенизировали непосредственно в буфере SDS-PAGE. Электрофорез проводили в 8 % ПААГ, белки переносили на мембрану Hybond ECL (GE Healthcare) полусухим методом с буфером 25 мМТрис, 0,2 М глицина, 20 % метанола и 0,01 % ДСН при силе тока 1,5–2. мА/см2 в течение 1,5 ч. После переноса мембраны блокировали 5% блокирующим агентом ECL (GE Healthcare) в TBST (20 мМ Трис-HCl, pH 7,6, 0,14 М NaCl, 0,01% Твин 20) в течение 1 часа. После блокировки мембрану инкубировали с первичными антителами в течение 12 ч: анти-фосфо-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) поликлональными кроличьими антителами (9101, Cell Signaling) к фосфо-ERK1/2; поликлональные кроличьи антитела против p44/42 MAPK (ERK1/2) (9102, Cell Signaling) для общего ERK1/2; кроличий поликлональный антисинапсин фосфо-Ser62/67 (AB9848, Millipore) для фосфофосинапсин; поликлональные кроличьи антитела против синапсин I (AB1543P, Millipore) для общего синапсин; анти-актин, клон C4 мышиное моноклональное антитело (MAB1501, Millipore) к актину, в разведениях, рекомендованных производителями. После этого мембрану промывали четыре раза по 10 мин ТБСТ и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, антикроличьими (A0545, Sigma-Aldrich) или антимышиными (A2304, Sigma-Aldrich), в зависимости от типа. первичных антител используют в течение 1 ч в разведении, рекомендованном производителем. Для удаления связанных первичных и вторичных антител и

повторного зондирования мембраны промывали Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (ThermoFisher Scientific). Для обнаружения сигнала использовали хемилюминесцентный субстрат SuperSignal West Pico PLUS (ThermoFisher Scientific). Уровень сигналов измеряют с помощью системы документирования геля ChemiDoc MP и программы Quantity One 1-D Analysis Software (BioRad). Оптические плотности полос анализировали на квантованном изображении с помощью программы ImageJ. Все экспериментальные группы были независимо проанализированы три раза, чтобы исключить возможное влияние неравного переноса или гибридизации на стадии иммуноблоттинга.

2.10.4 Гистологический метод исследования

Исследование выполнено в лаборатории иммуногистохимии и клеточных моделей Сеченовского университета. Для изучения гистопатологии используовали окраску гемотоксилином с эозином. Микрофотографирование препаратов осуществляли с помощью микроскопа Olympus SZ-CTV (Япония) и изучали посредством световой микроскопии при 200-кратном увеличении. Исследование проводили на 7-й день после моделирования глобальной ишемии (ИИ) мозга с помощью перевязки двух сонных артерий в контрольной группе и группе, получавшей ГИЖ-272 (10 мг/кг/ в течение 7 дней). Образцы ткани мозга были вырезаны, обезвожены и пропитаны парафином. Производили подсчёт неизмененных и гиперхромных нейронов пирамидного и полиморфного слоев CA1 области гиппокампа и нейронов зубчатой фасции гиппокампа, а также слоев коры больших полушарий. Измеряли количество сморщенных и пикнотических нейронов, определяли относительное количество нейронов в нескольких полях зрения с последующим пересчетом на 0,01 мм². У каждого животного производили изменения в 4-х срезах коры больших полушарий, в 4-х срезах зоны CA3 гиппокампа и в 4-х срезах зубчатой фасции гиппокампа (DG) с занесением данных в таблицу MS Excel и Statistica 10.0.

Каждая группа животных состояла из 7-8 крыс: 1) интактный контроль (физ. р-р/7дней), 2) контроль с ИИ (физ. р-р/7дней), 3) ИИ + ГИЖ-272 (60 мг/кг/7дней).

2.11 Статистическая обработка результатов

При статистической обработке количественных показателей нормальность распределения выборок проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, гомогенность – дисперсий по Левену. В случае нормальности распределений для сравнения двух выборок использовали парный (зависмые выборки) и непарный критерий (независимые выборки) t-критерий Стьюдента. При необходимости для сравнения независимых выборок использовали приближение t-критерия Стьюдента для неравных дисперсий. В случае сравнения более двух нормально распределенных независимых выборок при гомогенности дисперсий использовали однофакторный

дисперсионный анализ с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену-Кейлсу или по Даннету. При сравнении более 2 зависмых нормально распределенных выборок использовали дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету. Полученные результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Статистическую значимость коэффициентов регрессии и корреляции проводили с помощью t-критерия Стьюдента и доверительных интервалов.

При несоблюдении допущений необходимых для применения параметрических методов применяли непараметрические критерии: для сравнения 2 независимых выборок использовали критерий Манна-Уитни, 2 зависимых выборок - знаково-ранговый критерий Вилкоксона. Для сравнения более 2 выборок использовали непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллиса с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Полученные результаты представляли в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей.

Данные измеренные в бинарных шкалах обрабатывали с помощью критерия точной вероятности Фишера с учетом множественности сравнений. Расчет $ЭД_{50}$, $ЛД_{50}$ проводили методом пробит анализа (метод Финни). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программ Excel 2016, MS Excel Stat 2014., Statistica 10.0, GraphPadPrism 8 и Biostat.

Во всех случаях результаты считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3 Изучение спектра противосудорожных эффектов производных оксимов бензоилпиридина, дибензофуранона и производных фенилпирролидона в острых тестах судорог (МЭШ и коразол) и их возможных побочных эффектов в тестах острой токсичности с оценкой преимуществ перед противоэпилептическими препаратами первой линии

3.1 Изучение противосудорожных эффектов производных оксимов бензоилпиридина в тестах максимального электрошока (МЭШ) и антагонизма с коразолаом

Исследование проводили на беспородных мышах самцах, массой 22-24 г. Были изучены соединения ГИЖ-301, ГИЖ-292, ГИЖ-311, ГИЖ-277, ГИЖ-298, ГИЖ-162, ГИЖ-323 – производные оксимов 3- и 4- бензоилпиридина. Химическая структура соединений представлена в разделе «Материалы и методы». В качестве препаратов сравнения использовали вальпроевую кислоту, топирамат, карбамазепин.

3.1.1 Исследование противосудорожной активности производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина в тесте МЭШ

При изучении влияния соединения ГИЖ-301 на судороги, вызванные МЭШ у мышей, установлено, что ГИЖ-301 в дозах 50, 100 и 150 мг/кг достоверно устраняет тонико-экстензорные судороги. ГИЖ-301 в дозе 50 мг/кг увеличивает показатель выживаемости на 50 %, а в дозах 100 и 150 мг/кг – на 75 и 100 % ($p \leq 0,05$). При снижении дозы соединения до 5 и 10 мг/кг ГИЖ-301 не оказывает противосудорожного действия (таблица 2).

Соединение ГИЖ-292 в исследуемых дозах 5 и 15 мг/кг не оказывает влияния на судороги и не меняет показатель выживаемости у мышей относительно значений контроля в тесте антагонизма с МЭШ (таблица 2).

При изучении противосудорожного действия соединения ГИЖ-311 в диапазоне доз от 1,25 до 100 мг/кг, установлено, что ГИЖ-311 оказывает умеренное противосудорожное действие в дозе 2,5 мг/кг и не влияет на судороги и выживаемость при повышении дозы (таблица 2).

Соединение ГИЖ-277 в дозах 10, 30 и 100 мг/кг не обладает противосудорожным действием и не защищает животных от гибели в тесте антагонизма с МЭШ (таблица 2).

Изучение противосудорожного действия соединения ГИЖ-275 в дозах от 5, 10, 20 и 100 мг/кг, показало, что соединение ГИЖ-275 в исследуемом диапазоне доз не оказывает влияния на тонико-клонические судороги и на выживаемость мышей в тесте антагонизма с МЭШ (таблица 2).

Изучение производных 3-бензоилпиридина в тесте МЭШ показало высокую активность у соединения ГИЖ-301 в широком диапазоне доз (50 до 150 мг/кг), которое устраняет тонико-экстензорные судороги и предотвращает гибель животных и умеренную противосудорожную активность у соединения ГИЖ-311 в дозе 2,5 мг/кг.

Таблица 2 – Влияние оксимов 3-бензоилпиридина (в/б) на выраженность судорожных проявлений и гибель мышей в тесте антагонизма с МЭШ (500V/145 mA/0.3 s)

Группа животных	Доза, мг/кг	500V/144 mA/0.3 s/ однократно	
		Баллы	Количество выживших мышей, % (a.e)
Контроль	-	3.93 ± 0.07	7 (1/14)
ГИЖ-301	5	3.63 ± 0.18	37.5 (3/8)
	10	3.50 ± 0.19*	50 (4/8)#
	50	3.50 ± 0.19*	50 (4/8)#
	100	3.25 ± 0.16**	75 (6/8)#
	150	2.88 ± 0.13***	100 (8/8)#
Контроль	-	3.75 ± 0.16	25 (2/8)
ГИЖ-292	5	3.90 ± 0.10	12.5 (1/8)
	20	4.00 ± 0.00	0 (0/8)
Контроль	-	3.93 ± 0.07	7 (1/14)
ГИЖ-311	2,5	3.50 ± 0.19*	50 (4/8)#
	5	3.63 ± 0.18	37.5 (3/8)
	10	3.75 ± 0.16	25 (2/8)
	50	3.75 ± 0.16	25 (2/8)
	100	3.75 ± 0.16	25 (2/8)
Контроль	-	3.90 ± 0.10	12.5 (1/8)
ГИЖ-277	10	3.90 ± 0.10	12.5 (1/8)
	30	3.90 ± 0.10	12.5 (1/8)
	100	3.75 ± 0.16	25 (2/8)
Контроль	-	3.88 ± 0.09	12.5 (2/16)
ГИЖ-275	5	3.50 ± 0.19	50 (4/8)
	10	3.50 ± 0.19	50 (4/8)
	20	3.75 ± 0.16	25 (2/8)
	100	3.75 ± 0.16	25 (2/8)

Примечания: * при P≤0,05, ** при P≤0,01 и *** при P≤0,001 - достоверность значений от группы «МЭШ» (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета); # при P ≤0,05 – достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) (точный критерий Фишера); баллы: 1-клонические судороги передних конечностей, 2 - клонические судороги передних и задних конечностей, 3 – тонические судороги,4 – тонические судороги, заканчивающиеся гибелью.

Изучение влияния соединения ГИЖ-298 на судороги, вызванные МЭШ у мышей, показало, что ГИЖ-298 достоверно устраняет тонико-экстензорные судороги и увеличивает показатель выживаемости. Соединение ГИЖ-298 в дозе 5 мг/кг устраняет судороги и увеличивает выживаемость на 28,5 %, в дозах 10 и 20 мг/кг на 37,5 %. Соединение ГИЖ-298 достоверно увеличивает показатель выживаемости в дозе 40 мг/кг – на 50 %, в дозах 60 и 80 на 62,5 и 87,5 %, в дозах 100 и 150 мг/кг – на 100 % ($p \leq 0,05$). В дозах 0,5 и 1 мг/кг ГИЖ-298 не оказывает противосудорожного действия (таблица 3).

Установлено, что соединение ГИЖ-162 оказывает противосудорожное действие в тесте МЭШ у мышей, уменьшая тонико-экстензорные судороги и увеличивая показатель выживаемости. Соединение ГИЖ-162 в дозах 20 и 40 мг/кг достоверно увеличивает показатель выживаемости на 62,5 и 87,5 % и в дозе 80 мг/кг – на 100 % ($p \leq 0,05$). В дозах 5 и 10 мг/кг ГИЖ-162 не оказывает противосудорожного действия (таблица 3).

Изучение влияния соединения ГИЖ-323 на судороги, вызванные МЭШ у мышей, показало, что соединение достоверно уменьшает тонико-экстензорные судороги и увеличивает показатель выживаемости. Соединение ГИЖ-323 в дозе 60 мг/кг достоверно увеличивает показатель выживаемости на 66,7 % ($p \leq 0,05$). В дозах 5, 20 и 40 мг/кг ГИЖ-323 не оказывает противосудорожного действия (таблица 3).

Препарат сравнения вальпроевая кислота (ВК) устраняет тонико-экстензорные судороги в диапазоне доз от 200 до 240 мг/кг, увеличивая выживаемость животных на 60 и 80% соответственно (таблица 3).

Действие топирамата в устранении судорожных проявлений наблюдается в диапазоне доз от 60 до 100 мг/кг. В дозах 80 и 100 мг/кг топирамат увеличивает показатель выживаемости мышей до 62,5 % (таблица 3).

Таким образом, производные 4-бензоилпиридина показали высокую противосудорожную активность в широком диапазоне доз. Среди них наибольшей активностью обладают соединения ГИЖ-298 и ГИЖ-162, которые в жестких условиях МЭШ (500V/144 mA/0.3 с) увеличивают показатель выживаемости до 100 %. Действие вальпроевой кислоты (в более высоких дозах) и топирамата (в сопоставимых дозах) в тесте МЭШ менее выражено по сравнению с лидерными соединениями из класса 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298 и ГИЖ-162).

Для соединений ГИЖ-298 и ГИЖ-162 были рассчитаны $ЭД_{50}$ (доза, вызывающая эффект у 50 % животных в тесте МЭШ). ЭД50 для соединения ГИЖ-298 составила 16,4 (7,0–33,8) мг/кг, для ГИЖ–162 – 16,5 (10,5–25,2). Для топирамата 64,9 (44,2–112,1), а для вальпроевой кислоты - 205,8 (190,0–227,2).

Таблица 3 – Влияние оксимов 4-бензоилпиридина (в/б) на выраженность судорожных проявлений и гибель мышей в тесте антагонизма с МЭШ (500V/145 mA/0.3 s)

Группа животных	Доза, мг/кг/в/б	500V/144 mA/0.3 s/ однократно	
		Баллы	Количество выживших мышей, % (а.е)
Контроль	-	4.00 ± 0.00	0 (0/16)
ГИЖ-298	1	3.88 ± 0.13	12.5 (1/8)
	5	3.75 ± 0.16	25.0 (2/8)
	10	3.63 ± 0.18	37.5 (3/8)
	20	3.63 ± 0.18	37.5 (3/8)
	40	3.50 ± 0.19*	50 (4/8)
	60	3.38 ± 0.18*	62.5 (5/8)#
	80	3.00 ± 0.19**	87.5 (7/8)#
	100	2.88 ± 0.13***	100 (10/10)#
	150	2.75 ± 0.16***	100 (8/8)#
Контроль	-	3.90 ± 0.10	12.5 (1/8)
ГИЖ-162	5	3.90 ± 0.10	12.5 (1/8)
	10	3.90 ± 0.10	12.5 (1/8)
	20	3.38 ± 0.18*	62.5 (5/8)#
	40	3.00 ± 0.19**	87.5 (7/8)#
	80	2.75 ± 0.16***	100 (8/8)#
Контроль	-	3.63 ± 0.18	37.5 (3/8)
ГИЖ-323	5	3.38 ± 0.18	62.5 (5/8)
	20	3.38 ± 0.18	62.5 (5/8)
	40	3.25 ± 0.25	62.5 (5/8)
	60	2.75 ± 0.16***	100 (8/8)#
Контроль	-	4.00 ± 0.00	0 (0/16)
Вальпроевая кислота	160	3.90 ± 0.10	12.5 (1/8)
	180	3.80 ± 0.13	20 (2/10)
	200	3.50 ± 0.17*	50 (4/8)
	220	3.40 ± 0.16*	60 (6/10)#
	240	3.10 ± 0.18***	80 (8/10)#
Топирамат	20	4.00 ± 0.00	0 (0/8)
	40	3.63 ± 0.18	37.5 (3/8)
	60	3.50 ± 0.19*	50 (4/8)
	80	3.38 ± 0.18*	62.5 (5/8)#
	100	3.38 ± 0.18*	62.5 (5/8)#

Примечания: * при P≤0,05, ** при P≤0,01 и *** при P≤0,001 - достоверность значений от группы «МЭШ» (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета); # при P≤0,05 – достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) (точный критерий Фишера); баллы (1-клонические судороги передних конечностей, 2 - клонические судороги передних и задних конечностей, 3 – тонические судороги, 4 – тонические судороги, заканчивающиеся гибелью).

Противосудорожная активность соединения ГИЖ-298 в тесте с использованием электрошока малой силы

Использование электрошока малой интенсивности позволяет в динамике проследить развитие судорожного припадка. При обработке результатов использовали балльную систему оценки выраженности судорог - от 0 до 4 баллов: 0 – отсутствие реакций, 1 – клонус без потери рефлекса переворачивания, 2 – клонус с потерей рефлекса переворачивания, 2.5 – тонус передних/клонус задних конечностей (неполный тонус), 3 – тонические судороги передних и задних конечностей (полный тонус), 4 – тоническая экстензия конечностей с гибелью.

ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг/в/б полностью устраняет тоническую экстензию конечностей и генерализованные клонические судороги при однократном и, особенно, 5-ти кратном введениях. При регистрации выраженности судорожной активности в баллах, установлено, что соединение ГИЖ-298 в 2 раза эффективнее, чем топирамат при однократном введении и эффективнее в 3 раза, чем вальпроевая кислота при субхроническом (5-ти кратном) введении (таблица 4).

Соединение ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг при пероральном (per os) и внутрибрюшинном (в/б) путях введения в равной степени уменьшает количество животных с тонической экстензией и генерализованными клоническими судорогами, вызванными электрошоком малой силы. В группах мышей с вальпроевой кислотой при per os введении наблюдается снижение эффективности по сравнению с внутрибрюшинным введением (таблица 5).

Таблица 4 – Влияние ГИЖ-298 (в/б) на выраженность судорожных проявлений у мышей в тесте антагонизма с МЭШ малой силы (250V/12 mA/0.3 s)

Группа животных	Доза, мг/кг /в/б	250V/12 mA/0.3 s	
		Баллы	Количество мышей с тонической экстензией % (а.е.)
однократно			
Контроль МЭШ	-	3.25 ± 0.17	92 (11/12)
ГИЖ-298	5	2.6 ± 0.33	30 (3/10)
	20	2.75 ± 0.29	40 (4/10)
	60	1.1±0.11**	0 (0/10)#
Вальпроевая кислота	150	2.11 ± 0.20**	33 (3/9)#
	200	1.50 ± 0.32**	10 (1/10)#
карбамазепин	10	2.00 ± 0.22**	15 (2/13)#
	20	0.79 ± 0.19**	0 (0/14)#
Топирамат	100	2.25 ± 0.13*	30 (3/10)#

Продолжение таблицы 4

5 дней введения			
Контроль МЭШ 5дн	-	3.15 ± 0.19	85 (11/13)
ГИЖ-298 5дн	60	0.50 ± 0.17**	0 (0/10) #
Вальпроевая кислота 5дн	200	1.30 ± 0.33**	10 (1/10) #
карбамазепин 5дн	20	0.70 ± 0.30**	0 (0/10)#

Примечания: * при P≤0,05, ** при P≤0,01 и *** при P≤0,001 - достоверность значений от группы «МЭШ» (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета); # при P≤0,05 – достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) (точный критерий Фишера); баллы (0 – отсутствие реакций, 1-клонические судороги передних конечностей, 2 - клонические судороги передних и задних конечностей (с потерей рефлекса переворачивания), 2,5 - тонус передних/клонус задних конечностей (неполный тонус), 3 – тонические судороги передних и задних конечностей (полный тонус), 4 – тоническая экстензия конечностей с гибелью).

Таблица 5 – Сравнение эффективности ГИЖ-298 при разных путях введения (per os и в/б) по показателю выраженности судорожных проявлений у мышей в тесте антагонизма с МЭШ малой силы (250 V/ 12 мА, 0.3 s)

Группа животных	Способ введения/ доза, мг/кг	250 V/ 12 мА, 0.3 s	
		Баллы	Количество мышей с тонической экстензией % (а.е.)
Контроль	per os	3.20 ± 0.13	100 (10/10)
ГИЖ -298	per os/ 60	1.3 ± 0.09**	0 (0/10)#
	в/б / 60	1.2 ± 0.12**	0 (0/10)#
Вальпроевая кислота	per os /100	2.72 ± 0.19	72 (13/18)
	per os /200	2.00 ± 0.29*	31 (5/16)#
	per os /300	0.75 ± 0.16**	0 (0/8)#
	в/б / 200	1.50 ± 0.32**	10 (1/10)#

Примечания: * при P≤0,05, ** при P≤0,01 - достоверность значений от группы «МЭШ» (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета); # при P ≤0,05 – достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) (точный критерий Фишера); баллы (0 – отсутствие реакций, 1-клонические судороги передних конечностей, 2 - клонические судороги передних и задних конечностей (с потерей рефлекса переворачивания), 2,5 - тонус передних/клонус задних конечностей (неполный тонус), 3 – тонические судороги передних и задних конечностей (полный тонус), 4 – тоническая экстензия конечностей с гибелью).

Таким образом, в модели судорог, вызванных МЭШ, наибольшим противосудорожным эффектом обладают соединения ГИЖ-298 и ГИЖ-162, которые по активности и эффективности превосходят препараты сравнения вальпроевую кислоту и топирамат. Противосудорожные

эффекты ГИЖ-298 при per os пути введении в тесте электрошоковых судорог малой силы полностью повторяют эффекты при внутрибрюшинном введении, в отличие от вальпроевой кислоты.

3.1.2 Исследование противосудорожной активности производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина в тесте антагонизма с коразолом

Исследования были проведены на белых аутбредных мышах самцах. Коразол вводили подкожно в дозе 95-100 мг/кг в область холки через 35 минут после введения исследуемых соединений.

При изучении влияния соединения ГИЖ-301 в тесте антагонизма с коразолом на мышах, установлено, что соединение в дозе 100 мг/кг достоверно увеличивает продолжительность жизни животного и на уровне тенденции ЛП клонико-тонических судорог ($p \leq 0,1$). В дозе 0,5 и 50 мг/кг ГИЖ-301 не влияет на исследуемые показатели судорожных реакций (таблица 6).

Изучение влияния соединения ГИЖ-298 в тесте антагонизма с коразолом, показало, что ГИЖ-298 в дозах 20, 50 и 100 мг/кг достоверно увеличивает латентный период (ЛП) первого клонико-тонического приступа ($p \leq 0,05$), но не предотвращает гибель животных (показатель выживаемости не отличаются достоверно от контрольной группы) (таблица 6).

Изучение влияния соединений ГИЖ-275 (5 и 100 мг/кг) и ГИЖ-162 (20 и 50 мг/кг) на судороги, вызванные коразолом, показало, что соединения не оказывает противосудорожного действия и не влияет на показатели выживаемости, ЛП первого приступа (таблица 6).

Таблица 6 – Влияние производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина на судороги у мышей, вызванные коразолом

Группа животных	Доза, мг/кг	ЛП 1-ого приступа, с	Латентный период гибели, с	Кол-во выживших животных, % (а.е.)
Контроль	-	53±12	355±105	20 (4/10)
ГИЖ 301	0,5	65±29	311±109	0 (0/10)
	50	73±23	421±134	10 (1/10)
	100	96±18$	749±116*	20 (2/10)
Контроль	-	267±34	1396±261	40 (4/10)
ГИЖ 275	5	251±24	963±118	40 (4/10)
	100	312±45	1037±122	40 (4/10)
Контроль	-	42±9	409±117	11 (2/18)
ГИЖ-298	20	180±37*	735±224	12,5 (1/8)
	50	91±10*	457±126	20 (2/10)
	100	120±8*	435±98	40 (4/10)
Контроль	-	144±25	432±68	20 (4/20)
ГИЖ-162	20	113±22	367±42	10 (1/10)
	50	204±42	441±29	20 (2/10)

Примечание: *- достоверность отличий от группы контроля, при $P \leq 0,05$; $ - различия от контрольной группы на уровне тенденции, при $P \leq 0,1$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).

Среди изученных производных 3- и 4- бензоилпиридина не выявлено соединений, обладающих высокой активностью относительно судорог, вызванных коразолом по критерию выживаемости (%). Однако соединение ГИЖ-162 статистически достоверно увеличивает среднюю продолжительность жизни животных, а ГИЖ-298 - ЛП первого приступа.

Таким образом, соединения из ряда оксимов 3- и 4-бензоилпиридина имеют высокий противосудорожный эффект, сопоставимый с эффектами вальпроевой кислоты и топирамата (для ГИЖ-311) или превосходящий их (для ГИЖ-298, ГИЖ-162, ГИЖ-301, ГИЖ-323). Наиболее активными оказались соединения, имеющие этилморфолиновую (ГИЖ-298) и диметиламиноэтильную группы (ГИЖ-162), противосудорожные дозы которых были меньше, чем дозы вальпроевой кислоты и топирамата. Исследование ГИЖ-298 при пероральном введении показало тождественность выраженности противосудорожного эффекта при внутрибрюшинном введении.

3.2 Изучение противосудорожных эффектов производных оксимов дибензофуранона в тестах МЭШ и антагонизма с коразолом

3.2.1 Исследование противосудорожной активности производных оксима дибензофуранона в тесте антагонизма с МЭШ

В эксперименте использовали беспородных мышей самцов, массой 23-25 г. Исследовали соединения – ГИЖ-272, ГИЖ-276, ГИЖ-328, ГИЖ-338, ГИЖ-332, ГИЖ-327, ГИЖ-310, ГИЖ-310А и ГИЖ-333. В качестве препарата сравнения использовали вальпроевую кислоту.

Изучение влияния производных оксима дибензофуранона на судороги, вызванные МЭШ, показало, что ГИЖ-276 при однократном введении достоверно увеличивает показатель выживаемости на 50% в дозах 30, 40, 60 и 100 мг/кг относительно контрольной группы. В дозах 5, 10 и 80 мг/кг исследуемое соединение не оказывало влияния на показатель выживаемости (таблица 7).

Увеличению выживаемости мышей в среднем на 40% после судорог, вызванных МЭШ, относительно контрольной группы ($p \leq 0,05$) способствовало соединение ГИЖ-328 при введении его в дозах 40 и 60 мг/кг. При этом, в дозе 40 мг/кг увеличение количества выживших мышей (%) сопровождалось устранением тонической фазы судорог, что выражалось в снижении баллов (таблица 7).

ГИЖ-338 при введении в дозе 20 мг/кг устранял тоническую экстензию конечностей, вызванную нанесением МЭШ через корнеальные электроды, тем самым увеличивал выживаемость животных на 40% относительно контрольных значений ($p \leq 0,1$). При введении соединения в дозе 40 мг/кг эффективность исчезала (таблица 7).

ГИЖ-272 при введении мышам в дозе 20 м/кг способствовал увеличению показателя выживаемости животных на 35%, имевшего тенденцию к статистической достоверности, но, при увеличении дозы в 2 раза эффективность исчезала (таблица 7).

Изучение влияния ГИЖ-327 на судороги, вызванные МЭШ, показало, что соединение в дозах 30 и 40 мг/кг способствует значительному устранению тонических судорог, тем самым увеличивая показатель выживаемости на 45.6 - 66.5% ($p \leq 0,05$). С повышением дозы до 60 мг/кг эффективность соединения снижалась: ГИЖ-327 защищал от гибели 43% мышей ($p=0,054$). В низких дозах 5 и 20 мг/кг противосудорожный эффект ГИЖ-327 не проявлялся (таблица 7).

Изучение влияния ГИЖ-310А на судороги, вызванные МЭШ, показало, что соединение в дозе 50 мг/кг способствовало увеличению выживаемости животных на 50% ($P \leq 0.1$), не достигшее, однако, статистической достоверности. В дозах 5 и 20 мг/кг не наблюдалось защитного эффекта ГИЖ-310А на развитие судорожных проявлений и, как следствие, на выживаемость (таблица 7).

Противосудорожный эффект соединения ГИЖ-332 проявлялся при введении в диапазоне низких доз 5, 10 мг/кг и в дозе 40 мг/кг. Максимальная защита от гибели, вызванной МЭШ, наблюдалась в дозе 10 мг/кг, при этом снижалось количество животных с тоническими судорогами и, впоследствии, погибших на 50%. В дозах 5 и 40 мг/кг соединение также увеличивало количество мышей без тонической экстензии и защищало от гибели на 40% больше относительно группы контроля с МЭШ. Однако ГИЖ-332 не препятствовал действию МЭШ в дозе 20 мг/кг (таблица 7).

При введении ГИЖ-333 в дозах 2.5, 20 и 40 мг/кг не развивалось противосудорожного эффекта достаточного для прекращения судорожных реакций, вызванных МЭШ (таблица 6).

Препарат сравнения вальпроевая кислота устраняла тонико-экстензорные судороги в диапазоне доз от 200 до 240 мг/кг. В дозе 240 мг/кг наблюдалось увеличение выживаемости мышей до 80 % (таблица 7).

Таблица 7 - Влияние производных оксима дибензофуранона на судороги у мышей, вызванные максимальным электрошоком (МЭШ)

Группа животных	Доза, мг/кг	Баллы	Количество выживших мышей, % (a.e)
Контроль	-	4.0 ± 0.00	0 (0/23)
ГИЖ-276	5	4.0 ± 0.00	0 (0/6)
	10	3.83 ± 0.15	17 (1/6)
	20	3.43 ± 0.22	36 (5/14)#
	30	3.31 ± 0.19*	50 (8/16)#

Продолжение таблицы 7

Группа животных	Доза, мг/кг	Баллы	Количество выживших мышей, % (a.e)
ГИЖ-276	40	3.11 ± 0.19*	50 (4/8)#
	60	3.50 ± 0.18*	50 (4/8)#
Контроль	-	3.67 ± 0.15	36 (9/25)
ГИЖ-328	40	1.88 ± 0.45*	75 (6/8)$ P=0.1
	60	3.00 ± 0.22*	78 (7/9)#
Контроль	-	3.50 ± 0.6	37.5 (6/16)
ГИЖ-338	20	3.20 ± 0.4	80 (8/10)$ P=0.099
	40	3.30 ± 0.9	40 (4/10)
Контроль	-	3.32 ± 0.25	32 (6/19)
ГИЖ-332	5	2.41 ± 0.8*	80 (8/10)$ P=0.099
	10	2.45 ± 0.7*	90 (9/10)#
	20	3.0 ± 0.35	40 (4/10)
	40	2.83 ± 0.2	72 (13/18)#
	60	3.0 ± 0.35	40 (4/10)
ГИЖ-272	5	3.50 ± 0.45	25 (2/8)
	10	3.00 ± 0.18	37.5 (3/8)
	20	2.53 ± 0.32*	67 (10/15)$ P=0.082
	40	3.50 ± 0.45	25 (2/8)
	60	3.63 ± 0.18	37.5 (3/8)
Контроль	-	3.77 ± 0.11	21 (3/14)
ГИЖ-327	5	3.83 ± 0.15	17 (1/6)
	20	3.83 ± 0.15	17 (1/6)
	30	3.00 ± 0.19**	87 (7/8)#
	40	3.22 ±0.21*	67 (4/6)#
	60	3.36 ±0.12*	64 (9/14)$ P=0.054

Продолжение таблицы 7

Группа животных	Доза, мг/кг	Баллы	Количество выживших мышей, % (a.e)
Контроль	-	4.0 ± 0.00	0 (0/8)
ГИЖ-310А	5	3.75 ± 0.16	12 (1/8)
	20	3.63 ± 0.18	37.5 (3/8)
	50	3.21 ± 0.17	50 (4/8)$ P=0.077
Контроль	-	3.50±0.50	50 (5/10)
ГИЖ-333	2.5	3.70±0.46	30 (3/10)
	20	2.80±0.98#	60 (6/10)
	40	3.70±0.46	30 (3/10)
Контроль	-	4.0 ± 0.00	0 (0/10)
Вальпроевая кислота	220	3.0 ± 0.28**	60 (6/10)#
	240	2.15 ± 0.23**	80 (8/10)#

Примечание - # P≤0,05 и $ P≤0,1 по сравнению с контрольной группой (точный критерий Фишера); * P≤0,05 и ** P≤0,01 по сравнению с контрольной группой (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).

Таким образом, в модели судорог, вызванных МЭШ, наибольшим противосудорожным эффектом обладают соединения ГИЖ-332 и ГИЖ-327, ГИЖ-272 и ГИЖ-276, которые по активности превосходят вальпроевую кислоту.

3.2.2 Исследование противосудорожной активности производных оксима дибензофуранона в тесте антагонизма с коразолом

При изучении судорожных реакций, вызванных коразолом, установлено, что конвульсант вызывает развитие генерализованных судорожных клонико-тонических проявлений, приводящих к гибели 55-90% животных (таблица 8).

ГИЖ-276 в дозе 5 мг/кг при однократном введении увеличивал латентный период (ЛП) первого генерализованного клонического приступа на 77 с. (p≤0.1), но при этом не защищал животных от гибели. В дозах 20 и 40 мг/кг ГИЖ-276 не влиял на судороги, спровоцированные коразолом, и показатель выживаемости (таблица 8).

Соединение ГИЖ-272 в дозе 40 мг/кг при однократном введении увеличивало в 2 раза время наступления первого приступа, тем самым задерживая развитие судорожных проявлений (p≤0,1), но не оказывало влияние на время гибели и количество выживших животных. В дозе 20 мг/кг противосудорожные эффекты ГИЖ-272 не проявлялись.

При введении соединения ГИЖ-332 в дозе 20 мг/кг наблюдалось увеличение времени наступления первого приступа в 2,3 раза и 100% выживаемость животных ($p \leq 0,05$). При введении данного соединения в дозе 40 мг/кг не отмечалось достоверных изменений судорожных реакций относительно контрольных значений (таблица 8).

ГИЖ-328 проявлял слабую противосудорожную активность относительно коразоловых судорог, незначительно отодвигая в дозе 40 мг/кг время наступления первого судорожного приступа и увеличивая выживаемость животных на 22% (таблица 8).

При введении соединений ГИЖ-310А, ГИЖ-333 и ГИЖ-327 в диапазоне доз 20 – 40 мг/кг не наблюдалось защитного эффекта от развития судорожных реакций и гибели, вызванных коразолом (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние производных оксимов дибензофуранона на судороги у мышей, вызванные коразолом

Группа животных	Доза, мг/кг	Латентный период 1-ого приступа, с	Латентный период гибели, с	Кол-во выживших животных, % (а.е.)
Контроль	-	167±20	710±118	10 (1/10)
ГИЖ-276	5	244±37#	965±70#	10 (1/10)
	20	169±24	534±74	0 (0/10)
	40	172±33	617±114	0 (0/10)
Контроль	_	1080±602	2307±449	40 (6/15)
ГИЖ-328	10	354±186	1422±824	44 (4/9)
	40	1900±3007	5993±2395	78 (7/8)
	60	1127±2279	4334±3336	56 (5/9)
ГИЖ-272	20	480±467	4987±3322	67 (6/9)
	40	1400±2224#	5047±3239	67 (6/9)
ГИЖ-332	5	293 ±116	920 ±377	10 (1/10)
	20	1980±2962#	7200±0,00*	100 (10/10)&
	40	334±141	2933±3214	33 (3/9)
Контроль	-	562 ±236	1 133 ±286	0 (0/8)
ГИЖ-338	20	447 ±138	1 720 ±525	40 (4/10)
	40	240 ±26	1 660 ±421	20 (2/10)
Контроль	-	411 ± 82	1237 ± 327	17 (2/12)
ГИЖ-327	10	402 ± 83	1870 ± 498	33 (3/9)
	20	586 ±95	2070 ± 498	44 (4/9)
	30	535 ± 96	1603 ± 445	33 (3/9)

Продолжение таблицы 8

ГИЖ-310	20	274 ± 44	1067 ± 125	0 (0/8)
	40	511 ± 174	1196 ± 209	0 (0/9)
ГИЖ-333	10	737 ± 203	1483 ± 302	11 (1/9)
	20	948 ± 394	2003 ± 436	33 (3/9)
	40	560 ± 143	1398 ± 451	22 (2/9)

Примечание - * - достоверность отличий от контрольной группы, при $P \leq 0{,}05$ и #-тенденция к достоверности (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета); & - достоверность отличий от контрольной группы, при $P \leq 0.05$ (точный критерий Фишера).

Таким образом, установлено, что производные оксима дибензофуранона ГИЖ-332 (5, 10, 40 мг/кг), ГИЖ-276 (20-100 мг/кг), ГИЖ-272 (20 мг/кг), ГИЖ-327 (30-60 мг/кг), ГИЖ-328 (40, 60 мг/кг) и ГИЖ-310А (50 мг/кг) обладают выраженным противосудорожным действием преимущественно в отношении припадков у мышей, моделируемых МЭШ, устраняют тоническую фазу первично-генерализованных судорог и защищают животных от гибели, увеличивая выживаемость мышей на 36 – 60% относительно контрольных значений. Анализ зависимости строения и действия показал, что наиболее активные соединения в тесте МЭШ имели радикал хлорбензоил (ГИЖ-332, ГИЖ-327), фторбензоил (ГИЖ-328) и дихлорбензоил (ГИЖ-276). В тесте антагонизма с коразолом наиболее выраженная противосудорожная активность отмечается у соединения ГИЖ-332 (20 мг/кг), которое не только увеличивает латентное время наступления первых генерализованных судорог, но и полностью предотвращает гибель животных. Выраженная противосудорожная активность в обоих тестах (МЭШ и коразол) наблюдается у соединений ГИЖ-332, а умеренная - у ГИЖ-276 и ГИЖ-272.

3.3 Изучение противосудорожных эффектов производных 4-фенилпирролидона в тестах МЭШ и антагонизма с коразола

В экспериментах использовали беспородных самцов крыс, массой 200-250 г и беспородных самцов мышей, массой 22-26 г. Исследовали производные 4-фенилпирролидона - ГИЖ-286, ГИЖ-290, ГИЖ-295, ГИЖ-296, ГИЖ-305 и препарат сравнения леветирацетам.

3.3.1 Исследование противосудорожной активности производных 4-фенилпирролидона в тесте судорог, вызванных МЭШ

Установлено, что проведение МЭШ через корнеальные электроды у контрольных животных вызывало тонико-клонические судороги у 100% мышей, при этом судороги заканчивались гибелью в 80% случаев (Таблица 9).

Соединение ГИЖ-286 в дозах 2.5, 5 и 10 мг/кг не устраняло тоническую экстензию и не предотвращало значимо клоническую фазу приступа, а также не защищало от гибели (Таблица 9).

Соединение ГИЖ-290 в дозе 0.5, 1 мг/кг, а также в дозе 10 мг/кг не устраняло клонико-тонические судороги и слабо защищало от гибели мышей. Однако ГИЖ-290 в дозе 2,5 мг/кг и 5 мг/кг устранял тоническую экстензию в 20-30% случаев и защищал от гибели 50-40% мышей (таблица 9).

Соединения ГИЖ-295, ГИЖ-296 и ГИЖ-305 в дозах 2.5, 5 и 10 мг/кг не устраняли тоническую экстензию и не предотвращали гибель животных (таблица 9).

Леветирацетам (2,5 мг/кг) не устранял тоническую экстензию и клоническую фазу приступа, не защищал от гибели. В дозе 600 мг/кг леветирацетам устранял тоническую экстензию у 25 % мышей и способствовал увеличению выживаемости на 30% (таблица 9).

Таблица 9 - Влияние производных 4-фенилпирролидона и леветирацетама в тесте МЭШ на мышах (параметры МЭШ для мышей - 100 mA, 50 Hz, 0,3 мс)

Группы животных	Доза, мг/кг	% мышей без тонических судорог	% (а.е.) выживших животных
Контроль	-	0	20 (6/30)
ГИЖ-286	2,5	0	0 (0/6)
	5,0	0	0 (0/6)
	10	0	0 (0/6)
ГИЖ-290	0,5	0	20 (2/10)
	1,0	10	40 (4/10)
	2,5	30	50 (5/10)*
	5,0	20	40 (4/10)
	10	10	10 (1/10)
ГИЖ-295	2,5	0	0 (0/6)
	5,0	0	33 (2/6)
	10	0	0 (0/6)
ГИЖ-296	2,5	0	17 (1/6)
	5,0	0	0 (0/6)
	10	0	0 (0/6)
ГИЖ-305	2,5	0	0 (0/6)
	5,0	0	17 (1/6)
	10	0	0 (0/6)
Леветирацетам	2,5	0	0 (0/6)
	600	25	50 (4/8)

Примечание - * - достоверность отличий от контрольной группы, при $P \leq 0,05$ (критерий Фишера).

3.3.2 Исследование противосудорожной активности производных 4-фенилпирролидона в тесте судорог, вызванных коразолом

Установлено, что у контрольных животных после введения коразола в дозе 90 мг/кг генерализованные клонические судороги передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания наблюдались у 84% мышей. Гибель животных составила 90% (таблица 10).

Соединение ГИЖ-286 в дозах 2,5-10 мг/кг не влиял на судорожные рекакуции, вызванные коразолом (таблица 10).

Соединение ГИЖ-290 в дозе 1,0 мг/кг не изменяло значения судорожных реакций относительно контроля. В дозе 2,5 мг/кг препарат не менял показатель ЛП 1-го клонического приступа, но увеличивал выживаемость мышей на 52,5%. В дозе 5 мг/кг соединение увеличивало как ЛП 1-го клонического приступа, так и выживаемость животных на 67,5%. В дозе 10 мг/кг противосудорожный эффект ГИЖ-290 ослабевал, статистически достоверно увеличивался только показатель ЛП 1-го клонического приступа (таблица 10).

Соединение ГИЖ-295 в дозах 2,5 – 10 мг/кг значимо увеличивало показатель ЛП 1-го клонического приступа и не влияло на показатель выживаемости мышей (таблица 10).

Соединение ГИЖ-296 в дозе 2,5 мг/кг значимо увеличивало показатель ЛП 1-го клонического приступа, однако не защищало от гибели. В дозах 5 и 10 мг/кг ГИЖ-296 не влиял на исследуемые показатели судорожных реакций (таблица 10).

Соединение ГИЖ-305 не имело противосудорожных эффектов ни в одной из исследуемых доз - от 2,5 до 10 мг/кг (таблица 10).

Леветирацетам в дозе 2,5 мг/кг не влиял на судороги, вызванные коразолом. В дозе 600 мг/кг препарат значимо увеличивал показатель ЛП 1-го клонического приступа, а также способствовал увеличению (недостоверно) выживаемости животных на 27,5% (таблица 10).

Таблица 10 – Влияние производных 4-фенилпирролидона и леветирацетама в тесте антагонизма с коразолом на мышах (m±S.E.M.)

Группа животных	Доза, мг/кг	ЛП 1-го клонического приступа, с	% (а.е.) выживших мышей
Контроль	-	135 ± 36	10 (1/10)
ГИЖ-286	2,5	166 ± 28	0 (0/8)
	5,0	178 ± 23	0 (0/8)
	10	137 ± 28	0 (0/8)
ГИЖ-290	1,0	115 ± 31	37,5 (3/8)
	2,5	120 ± 29	62,5 (5/8)#
	5,0	210 ± 26*	87,5(7/8)#
	10	288 ± 28*	37,5 (3/8)

Продолжение таблицы 10

Группа животных	Доза, мг/кг	ЛП 1-го клонического приступа, с	% (а.е.) выживших мышей
ГИЖ-295	2,5	200 ± 29*	0 (0/8)
	5,0	272 ± 44*	12,5 (1/8)
	10	260 ± 35*	0 (0/8)
ГИЖ-296	2,5	219 ± 37*	0 (0/8)
	5,0	230 ± 40	0 (0/8)
	10	170 ± 38	0 (0/8)
ГИЖ-305	2,5	91 ± 11	0 (0/8)
	5,0	182 ± 21	0 (0/8)
	10	176 ± 13	0 (0/8)
Леветирацетам	2,5	163 ± 32	0 (0/8)
	600	193 ± 30*	37,5 (3/8)

Примечание - * - достоверность отличий от контрольной группы, при $P \leq 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета); # - относительно контрольной группы, при $P \leq 0,05$ (точный критерий Фишера).

При изучении противосудорожных эффектов производных 4-фенилпирролидона в базисных тестах скрининга установлено, что среди соединений противосудорожным эффектом в тесте МЭШ обладал только ГИЖ-290 (2,5 мг/кг). Эффект соединения проявлялся в диапазоне доз от 2,5 мг/кг до 5,0 мг/кг через 30-40 минут после введения и выражался в его способности защищать животных от гибели, ослабляя тоническую фазу судорог.

В тесте антагонизма с коразолом достоверный противосудорожный эффект по показателю ЛП 1-го приступа оказывали соединения ГИЖ-290, ГИЖ-295, ГИЖ-296, а по показателю выживаемость только ГИЖ-290 (2,5 и 5 мг/кг). Леветирацетам не оказывал достоверного эффекта в тестах МЭШ и антагонизма с коразолом.

3.4. Изучение возможных побочных эффектов и острой токсичности лидерных соединений оксимов бензоилпиридина, дибензофурана и производных 4-фенилпирролидона

3.4.1 Изучение возможных побочных эффектов и острой токсичности лидерных соединений оксимов бензоилпиридина

Общее состояние и поведение животных оценивали визуально по следующим параметрам: изменение характера шерстяного покрова, изменение состояния слизистых оболочек, наличие птоза верхнего века, наличие повышенных уринации, дефекации, саливации, наличие пилоэрекции, вокализации, бокового положения, наличие нарушения ритма и глубины дыхательных движений, наличие агрессивности, изменение слуховой реакции, повышенная

пугливость, наличие тремора, судорог, изменение позы, наличие пинеального, роговичного рефлексов, каталепсии, стереотипии и груминга.

Для оценки неврологического дефицита использовали методики «Вращающийся стержень» («RotaRod») и «Перекладина», в которых оценивали моторные нарушения и нарушения тонуса. Подробное описание методов изложено в разделе «Материалы и методы».

Установлено, что соединения ГИЖ-301 в диапазоне доз от 5 до 150 мг/кг, не вызывает повышения возбудимости, тремора, судорожных проявлений, гиперкинезов, подергиваний, изменения цвета кожных покровов и слизистых, взъерошенности шерсти, каталепсии, птоза, стереотипии, агрессии и груминга у мышей. Не изменяют болевой, роговичный и пинеальный рефлексы. Соединение ГИЖ-301 не оказывает негативного влияния на координацию движений, регистрируемую по способности животных удерживаться на вращающемся стержне и не вызывает нарушения мышечного тонуса в тесте подтягивания на перекладине у мышей (таблица 11).

ГИЖ-298 в диапазоне доз от 0,5 до 150 мг/кг, ГИЖ-162 – от 5 до 80 мг/кг, не вызывают повышения возбудимости, тремора, судорожных проявлений, гиперкинезов, подергиваний, изменения цвета кожных покровов и слизистых, взъерошивания шерсти, каталепсии, птоза, стереотипии, агрессии и груминга у мышей. Не изменяют болевой, роговичный и пиннеальный рефлексы. Соединение ГИЖ-298 в дозе 100 мг/кг не оказывает негативного влияния на координацию движений у мышей, регистрируемую по способности животных удерживаться на вращающемся стержне и не вызывает нарушения мышечного тонуса в тесте подтягивания на перекладине у мышей. Однако, при увеличении дозы соединения ГИЖ-298 до 150 мг/кг отмечаются падения со стержня у 50% мышей, и неспособность подтянутся на перекладину у 33 % животных. В дозе 200 мг/кг регистрируется падение со стержня у 50% мышей, а количество не подтянувшихся увеличивается до 100% (таблица 11).

Соединение ГИЖ-162 в дозах от 5 до 80 мг/кг не оказывает негативного влияния на координацию движений и не влияет на мышечный тонус (таблица 11).

Вальпроевая кислота в дозе 150 мг/кг не оказывает негативного влияния на координацию движений и не влияет на мышечный тонус у мышей. В дозе от 300 до 500 мг/кг ВК вызывает нарушение координации движения животных и нарушение мышечного тонуса, отмечается падение со стержня и неспособность подтянуться на перекладину (таблица 11).

Таблица 11 - Показатели неврологического дефицита производных 3- и 4-бензоилпиридина

Группа животных (терапевтическая доза)	Доза, мг/кг	Тест «Вращающийся стержень»	Тест «Перекладина»
		кол-во падений животных в % (а.е.)	кол-во подтянувшихся животных в % (а.е.)
Контроль	-	0 (0/6)	100 (6/6)
ГИЖ-301 (100 мг/кг)	50	0 (0/6)	100 (6/6)
	150	0 (0/6)	100 (6/6)
	300	-	-
ГИЖ-162 (40 мг/кг)	40	0 (0/6)	100 (6/6)
	80	0 (0/6)	100 (6/6)
	200	-	-
	400	-	-
ГИЖ-298 (60 мг/кг)	100	0 (0/6)	100 (6/6)
	150	50 (3/6)	33 (2/6)
	200	50 (3/6)	0 (0/6)
	300	-	-
	400	-	-
Вальпроевая кислота	150	0 (0/6)	84 (5/6)
	300	33 (2/6)	66 (3/6)
	400	50 (3/6)	50 (3/6)
	500	100 (6/6)	0 (0/6)

Установлено, что соединение ГИЖ-301 в дозах до 150 мг/кг через 24 часа не вызывает гибель животных, тогда как при увеличении дозы до 300 мг/кг наблюдается гибель мышей до 83% (таблица 12).

Изучение острой токсичности соединения ГИЖ-298 показало, что ГИЖ-298 при введении в дозе до 200 мг/кг через 24 часа не вызывает гибель животных. При введении соединения ГИЖ-298 в дозе 300 мг/кг наблюдалась гибель 33 % животных через 24 часа после введения, а после введения соединения ГИЖ-298 в дозе 400 мг/кг через 24 часа погибло 83 % животных (таблица 12).

Соединение ГИЖ-162 через 24 часа после однократного введения в дозе до 80 мг/кг не вызывает гибели животных. При увеличении дозы до 200 мг/кг и 400 мг/кг происходит увеличение гибели до 66 % и 83% животных соответственно (таблица 12).

Вальпроевая кислота в дозе 300 мг/кг не вызывает гибели мышей через 24 часа, а в дозах 400 мг/кг и 500 мг/кг - гибель 33 %, дозе 500 мг/кг – 66 % животных (таблица 12).

Таблица 12 - Изучение влияния производных 3- и 4-бензоилпиридина на выживаемость мышей при однократном введении

Группа животных	Доза, мг/кг	Гибель
		кол-во погибших животных за 24 часа наблюдений в % (а.е.)
Контроль	-	0 (0/6)
ГИЖ-301 (100 мг/кг)	50	0 (0/6)
	150	0 (0/6)
	200	17 (1/6)
	300	83 (5/6)
ГИЖ-162 (40 мг/кг)	40	0 (0/6)
	80	0 (0/6)
	200	66 (4/6)
	400	83 (5/6)
	450	100 (6/6)
ГИЖ-298 (60 мг/кг)	100	0 (0/6)
	150	0 (0/6)
	200	0 (0/6)
	300	33 (2/6)
	400	83 (5/6)
	450	83 (5/6)
Вальпроевая кислота	150	0 (0/6)
	300	0 (0/6)
	400	33 (2/6)
	500	66 (4/6)
	550	83 (5/6)

Таким образом, производные оксимов 4-бензоилпиридина – соединения ГИЖ-298, ГИЖ-162 - в широком диапазоне доз (0,5-100 мг/кг) не вызывают появления возбудимости и седативных проявлений, тремора, судорожных проявлений, изменения цвета кожных покровов и слизистых, пилоэрекции, каталепсии, птоза, стереотипии и груминга; не изменяются пороги болевой чувствительности и агрессии; не вызывают неврологического дефицита (нарушение координации движения и мышечного тонуса) в тестах вращающегося стержня и подтягивание не перекладине. Установлено, что при внутрибрюшинном введении соединений у самцов мышей среднесмертельные дозы ($ЛД_{50}$ - доза, вызывающая гибель 50 % животных) составляют: для ГИЖ-298 - 310 (280–321) мг/кг, для ГИЖ-162 - 174 (134–232) мг/кг, для ГИЖ-301 - 242 (186–287) мг/кг. $ЛД_{50}$ для вальпроевой кислоты - 457 (380-534) мг/кг. Таким образом, наиболее благоприятным профилем безопасности при исследовании неврологического дефицита и гибели животных обладает ГИЖ-298. На основании значения $ЭД_{50}$ (доза, вызывающая эффект у 50 % животных в тесте МЭШ) и $ЛД_{50}$ терапевтический индекс ($ТИ=ЛД_{50}/ЭД_{50}$) для ГИЖ-298 составил более 19, тогда как для вальпроевой кислоты более 2. Полученные данные позволяет выделить соединение ГИЖ-298 из рядов 3- и 4-бензоилпиридина в качестве соединения-лидера для дальнейшего изучения. В соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 соединение ГИЖ-298 при внутрибрюшинном введении относится к малотоксичным соединениям.

3.4.2 Изучение возможных побочных эффектов и острой токсичности лидерных соединений производных оксима дибензофуранона

Эксперименты проводили на беспородных мышах-самцах массой 24-28 г. Исследование осуществляли через 1 и 24 часа после введения внутрь ГИЖ-332 (1000 мг/кг), ГИЖ-328 (1000 мг/кг), ГИЖ-276 (1000 мг/кг), ГИЖ-272 (1000 мг/кг).

Установлено, что соединения ГИЖ-276, ГИЖ-272, ГИЖ-328, ГИЖ-332 в средней терапевтической дозе (40 мг/кг) и в дозах в 10 и 25 раз превышающих эффективную 400 мг/кг и 1000 мг/кг не оказывали негативного влияния на координацию движений, регистрируемую по способности животных удерживаться на вращающемся стержне, и не влияли на мышечный тонус мышей, регистрируемый в тесте «Перекладина». Полученные значения статистически значимо не отличались от соответствующих параметров контрольных групп, что свидетельствует об отсутствии токсического влияния на мышечный тонус животных и координацию движений (таблица13).

Соединения ГИЖ-276 (1000 мг/кг), ГИЖ-272 (1000 мг/кг) не оказывали влияния на показатели поведенческих (вокализация, спонтанная агрессивность, стереотипия, груминг) и вегетотропных (состояние шерстяного покрова, слизистых оболочек, саливация, уринация,

дефекация, дыхательные движения, зрачковые рефлексы) реакций, но вызывали изменение нервно-мышечных реакций. Так, ГИЖ-276 в дозе 1000 мг/кг вызывал появление птоза верхнего века у 3 из 6 мышей через 1 час после введения. Через 24 часа регистрации данное нарушение не наблюдалось. При введении ГИЖ-272 в дозе 1000 мг/кг наблюдалось изменение слуховой реакции животных на хлопок у 3 из 6 мышей через 1 час после введения соединения, которое не проявлялось при повторной регистрации через 24 часа (таблица 13).

ГИЖ-332 (1000 мг/кг) через 1 час после введения оказывал влияние на нервно-мышечную реакцию, вызывая полуптоз верхнего века у 100% животных, и на вегетотропный показатель, вызывая пилоэрекцю у 17% мышей, а также появлялись негативные поведенческие реакции, такие как груминг и седация у 17% и 66% животных соответственно. Через 24 часа после введения соединения, выявленные ранние нарушения, не проявлялись (таблица 13).

Через 1 час после введения ГИЖ-328 (1000 мг/кг) наблюдалось усиление груминга у 66% животных, наличие полуптоза верхнего века у 100% и седация у 33% животных. По остальным регистрируемым показателям нейротоксических эффектов отличий от группы контроля не наблюдалось (таблица 13). Все выявленные нарушения не проявлялись при повторной регистрации показателей через 24 часа после введения соединения (таблица 13).

Гибели и наличия бокового положения у мышей, получавших ГИЖ-276, ГИЖ-272, ГИЖ-328, ГИЖ-332 в максимально введенной дозе 1000 мг/кг отмечено не было (таблица 13).

Таблица 13 - Изучение острой токсичности и возможных побочных эффектов производных оксимов дибензофуранона

Группа (терапевти-ческая доза, мг/кг)	Доза, мг/кг	Тест «Вращающийся стержень»	Тест «Перекладина»	Гибель
		Кол-во падений животных в % (а.е.)	Кол-во подтянувшихся животных в % (а.е.)	Кол-во погибших животных за 24 часа наблюдений в % (а.е.)
Контроль	-	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
ГИЖ-332 (20 мг/кг)	40	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	400	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	1000	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	40	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
ГИЖ-328 (60 мг/кг)	400	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	1000	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)

Продолжение таблицы 13

Контроль	-	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
ГИЖ-276 (30 мг/кг)	40	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	400	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	1000	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
ГИЖ-272 (40 мг/кг)	40	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	400	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	1000	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)

Таким образом, соединения ГИЖ-276, ГИЖ-272, ГИЖ-328, ГИЖ-332 в терапевтической дозе 40 мг/кг и десятикратно ее превышающей, в дозе 400 мг/кг, при однократном введении в течение 1 суток не вызывают изменения характера шерстяного покрова, состояния слизистых оболочек, не вызывают появления полуптоза верхнего века, появления возбудимости и седативных проявлений, спонтанной агрессивности, тремора, судорожных проявлений, каталепсии, стереотипии и груминга, при этом не изменяются пороги болевой чувствительности. При увеличении дозы в 25 раз (1000 мг/кг) наблюдается временное (в течение 1 часа) появление некоторых негативных реакций, таких как птоз верхнего века (ГИЖ-332, ГИЖ-328, ГИЖ-276) и изменение слуховых реакций (ГИЖ-272).

Исследование острой токсичности показало, что соединения ГИЖ-276, ГИЖ-272, ГИЖ-328, ГИЖ-332 в дозе 1000 мг/кг не вызывают гибели животных и развития неврологического дефицита при регистрации через 1 час и 24 часа после их однократного внутрибрюшинного введения. Отсутствие гибели животных в ответ на введение доз в 25 раз превышающих терапевтические свидетельствует о том, что ГИЖ-276, ГИЖ-272, ГИЖ-328, ГИЖ-332 относятся к нетоксичным соединениям в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76.

3.4.3 Изучение возможных побочных эффектов и острой токсичности производного 4- фенилпирролидона, соединения ГИЖ-290

Соединение ГИЖ-290 в терапевтическом диапазоне доз (0,5-20 мг/кг) не вызывало у мышей нарушения общего состояния, поведения и простых рефлексов и не нарушало координацию движений в тесте вращающегося стержня. ГИЖ-290 в дозе 100 мг/кг оказывал негативное влияние на координацию движений у 50% мышей, регистрируемую по способности животных удерживаться на вращающемся стержне, и не влиял на мышечный тонус мышей, регистрируемый в тесте «Перекладина» (таблица 14). ГИЖ-290 в дозах 20, 50, 100 и 300 мг/кг

(однократно, в/б) не вызывал гибели животных через 24 часа, однако, при увеличении дозы до 500 мг/кг наблюдалось гибель 50% мышей (таблица 14).

Леветирацетам в дозах 300 и 600 мг/кг не вызывал каких-либо негативных побочных эффектов на нейромышечную передачу и вегетативные реакции. В дозе 1000 мг/кг леветирацетам вызывал гибель у 33% мышей (таблица 14).

Таким образом, ГИЖ-290 в дозе в 100 раз превышающей терапевтическую не вызывает нейротоксический эффект и является малотоксичным соединением.

Таблица 14 - Изучение острой токсичности соединения ГИЖ290 и его способности вызывать неврологический дефицит

Группа (терапевтическая доза, мг/кг)	Доза, мг/кг	Тест «Вращающийся стержень»	Тест «Перекладина»	Гибель
		Кол-во падений животных в % (а.е.)	Кол-во подтянувшихся животных в % (а.е.)	Кол-во погибших животных за 24 часа наблюдений в % (а.е.)
Контроль	-	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
ГИЖ-290 (5 мг/кг)	10	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	20	0 (0/8)	87.5 (7/8)	0 (0/8)
	100	50 (3/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	300	-	-	0 (0/6)
	500	-	-	50 (3/6)
	600	-	-	67 (4/6)
Леветирацетам	300	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	600	0 (0/6)	100 (6/6)	0 (0/6)
	1000	100 (6/6)	0 (0/6)	33 (2/6)

Таким образом, LD_{50} для ГИЖ-290 при внутрибрюшинном введении мышам самцам составило 691,0 (465,5 – 545,1) мг/кг. В соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 соединение ГИЖ-290 при внутрибрюшинном введении относится к малотоксичным соединениям.

Заключение

На основании данных, полученных в результате скрининга с использованием тестов МЭШ и антагонизма с коразолом, были выявлены несколько соединений с высокой противосудорожной активностью: среди производных дибензофурана(-она) – ГИЖ-272, ГИЖ-332, производных 4-фенилпирролидона - ГИЖ-290 и производных 3,4-бензоилпиридина - ГИЖ-298. Для этих соединений были установлен диапазон терапевтических доз, диапазон токсических доз при остром введении и установлены дозы, вызывающие неврологический дефицит, рассчитана терапевтическая широта по формуле $ЛД_{50}/ЭД_{50}$ (таблица 15).

Таблица 15 – Активность и эффективность соединений-лидеров ГИЖ-298, ГИЖ272, ГИЖ-332 и ГИЖ-290

Показатели	Оксимы бензоил пиридина:	Оксимы дибензофурана:		4-фенил пирро лидоны:	Препараты сравнения:		
На б/п самцах мышах при в/б введении	ГИЖ-298	ГИЖ-272	ГИЖ-332	ГИЖ-290	Леветирацетам	Топирамат	Вальпроевая кислота
Диапозон терапевтических доз (по данным теста МЭШ и коразоловых судорог), мг/кг	20 – 60	10 – 30	5 – 30	2,5 – 10	100 – 600	60 - 100	150 – 280
$ЭД_{50}$, мг/кг	16,4 (7,0 –33,8)					64,9 (44,2–112,1)	205,8 (190,0–227,2)
LD_{50} (по данным острой токсичности) мг/кг	>300	>1000	>1000	>600	>1200	>600 (данные литературы)	>400
ТИ = $ЛД_{50}/ЭД_{50}$	>19	≈ 33	≈ 33	≈60		>9	>2

Анализ полученных результатов позволил выявить наиболее активные и малотоксичные соединения: из ряда производных оксима 3- и 4-бензоилпиридина – ГИЖ-298, из ряда производных оксимов дибензофурана - ГИЖ-272, ГИЖ-276 и ГИЖ-332, из ряда производных фенилпирролидона – ГИЖ-290. Лидерные соединения в широком диапазоне доз обладают выраженной противосудорожной активностью в тестах МЭШ и коразоловых судорог и имеют преимущества по активности и эффективаности перед противоэпилептическими препаратами

первой линии: вальпроевой кислотой, топираматом и леветирацетамом. Выявленные лидерные соединения характеризуются отсутствием неврологических дефицитов в широком диапазоне доз, имеют низкую токсичность и обладают большой терапевтической широтой, превосходящей в несколько раз этот показатель для вальпроевой кислоты и леветирацетама.

Полученные данные позволяют рассматривать соединения ГИЖ-298, ГИЖ-272, ГИЖ-276, ГИЖ-332 и ГИЖ-290 в качестве соединений-лидеров для дальнейшего исследования.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:

Жмуренко, Л.А. Синтез и противосудорожная активность производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридинов [Текст] / Л.А. Жмуренко, Т.А. Воронина, ***С.А. Литвинова****, Л.Н. Неробкова, И.О. Гайдуков, Г.В. Мокров, Т.А. Гудашева // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – 52(1). – С. 19-28* [30].

Кутепова И. С. Исследование противосудорожной активности производных фурана [Текст] / И. С. Кутепова, ***С.А. Литвинова,*** *Т.А. Воронина, Л.А. Жмуренко, Г.В. Мокров // Экспериментальная и клиническая фармакология. Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – 2018. – Т. 81, №. 5s. – С. 137-138 [49].*

Гайдуков И.О. Анализ зависимости между химическим строением и противосудорожной активностью в ряду производных 3- и 4-бензоилпиридина [Текст] / И.О. Гайдуков, ***С.А. Литвинова****, Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова, Л.А. Жмуренко, Г.В. Мокров // Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – 2018. – Т. 81, №. 5s. – С. 50-51 [18].*

Жмуренко Л.А. Синтез, противосудорожная, антигипоксическая и противоишемическая активность производных оксима дибензофуранона [Текст] / Жмуренко Л.А., ***Литвинова С.А.****, Кутепова И.С., Неробкова Л.Н., Мокров Г.В., Ребеко А.Г., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 11. – С. 9-16 [31].*

Воронина Т.А. Ориентированный поиск противоэпилептических препаратов. Производныек бензоилпиридина и фенилпирролидона – новые классы соединений с противосудорожной активностью [Текст] / Воронина Т.А., ***Литвинова С.А.****, Неробкова Л.Н., Ковалев И.Г, Гайдуков И.О., Авакян Г.Г., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В. // Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – 2018. – Т. 81, №. 5s. – С. 46-47 [9].*

Кутепова И.С. Противосудорожная активность производных дибензофурана в эксперименте [Текст] / Кутепова И.С., ***Литвинова С.А.,*** *Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Мокров Г.В., Жмуренко Л.А..// Экспериментальная и клиническая фармакология. -2019. Т. 82.№ 8. С. 3-8 [53].*

Жмуренко Л.А. Синтез, противосудорожная и ноотропная активность производных 4-фенилпирролидона [Текст] / Жмуренко Л.А., ***Литвинова С.А.,*** *Мокров Г.В., Ковалев И.Г., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Гудашева Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 5. – С. 20-27 [32].*

Gaydukov I.O. Anticonvulsant activity of new 3- and 4-benzoilpiridines oxime derivatives in comparison with valproic aci [Текст]/ I.O. Gaydukov, T. A Voronina, ***S. A. Litvinova,*** *I. S. Kutepova. Medicinal Chemistry Research.– 2020. Volume 29, Issue 4, Pages 783-792 [19].*

Глава 4 Изучение эффектов соединения-лидера из ряда оксимов бензоилпиридина (ГИЖ-298) на ЭпА мозга крыс на разных этапах формирования Эпи системы, в том числе развернутого эпилептического статуса, и изучение особенностей спектра его противоэпилептических и нейропсихотропных эффектов в сравнении с вальпроевой кислотой

Целью исследования было изучить влияние ГИЖ-298 на стадийное развитие эпилептической системы, сопровождаемое формированием вторичных, третичных и «зеркальных» очагов ЭпА в условиях кобальтовой модели эпилепсии. Хроническая кобальт-индуцированнная модель эпилепсии является адекватной моделью для изучения кортикальных и подкорковых очагов ЭпА у человека, которые синхронизируясь образуют сложную патологическую структурно-функциональную систему. Данная модель позволяет изучить особенности и механизм (ведущие структурные «мишени») действия противосудорожных веществ. По спектру противосудорожных эффектов препарата сравнения вальпроевой кислоты изучена способность ГИЖ-298 устранять развитие развернутого эпилептического статуса (Эпи статуса). С целью исследования влияния ГИЖ-298 на аудиогенные судороги были использованы крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ) с генетически детерминированной эпилепсией в возрасте 4 месяцев. В развитии судорожного припадка у крыс КМ ключевыми являются структуры ствола мозга, главные из которых - ядра верхнего (SC) и нижнего (IC) четверохолмия (corpora quadrigemina). Нейрональное возбуждение глубоких слоев нижнего четверохолмия, вызванное акустическим стимулом, распространяется на ретикулярную формацию и лимбические структуры среднего мозга, такие как гиппокамп и гипоталамус [76]. В тестах оценки нейропсихотропной активности изучено возможное наличие у соединения ГИЖ-298 антидепрессивных, анксиолитических свойств, а также влияние на когнитивные функции.

4.1 Исследование противосудорожной активности ГИЖ-298 в модели хронической фокальной (парциальной) эпилепсии, индуцированной кобальтом в сравнении с вальпроевой кислотой

Исследования проводили на белых беспородных крысах самцах, массой 250-300 г. С помощью стереотаксиса в структуры мозга (двигательная зона коры левого и правого полушарий, дорзальный отдел гиппокампа, латеральные ядра гипоталамуса) вживлялись хронические электроды. Эпилептогенный очаг создавался аппликацией порошка металлического кобальта на поверхность двигательной области коры левого полушария мозга. Регистрация у биопотенциалов мозга (ЭЭГ) осуществляли у свободноподвижных животных. Подсчитывались маркеры Эпи активности (число и длительность (сек) Эпи разрядов за минуту)

в структурах мозга с выявлением доминантного очага на первой ранней (через 48 ч) и второй, стабильной (через 5-6 дней) стадиях формирования Эпи системы.

На 1-й стадии формирования Эпи системы анализ биоэлектрической активности исследуемых структур мозга в контрольных группах животных (фон) через 48 часов (1-я стадия) после аппликации кобальта выявил образование очагов ЭпА во всех исследуемых структурах с наибольшей продолжительностью разрядов в ипсилатеральной коре и гиппокампе (рисунок 1, 2). Отмечалось значительное опережение в возникновении ЭпА в ипсилатеральной коре, что может свидетельствовать о формировании детерминантной (ведущей) структуры на данной стадии развития Эпи системы.

На 1-й стадии формирования Эпи системы ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг (при регистрации через 1 час после введения) статистически достоверно уменьшал число судорожных разрядов во всех исследованных структурах мозга - в ипси- и контрлатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе. При этом наибольшая выраженность эффекта (уменьшение разрядов в 1,6 раз) наблюдалась в ипсилатеральной коре и гипоталамусе. Наряду с сокращением числа разрядов в структурах мозга, соединение ГИЖ-298 достоверно уменьшало длительность разрядов в ипсилатеральной коре (в 1,4 раза) и гипоталамусе (в 1,6 раза) (рисунки 7, 8).

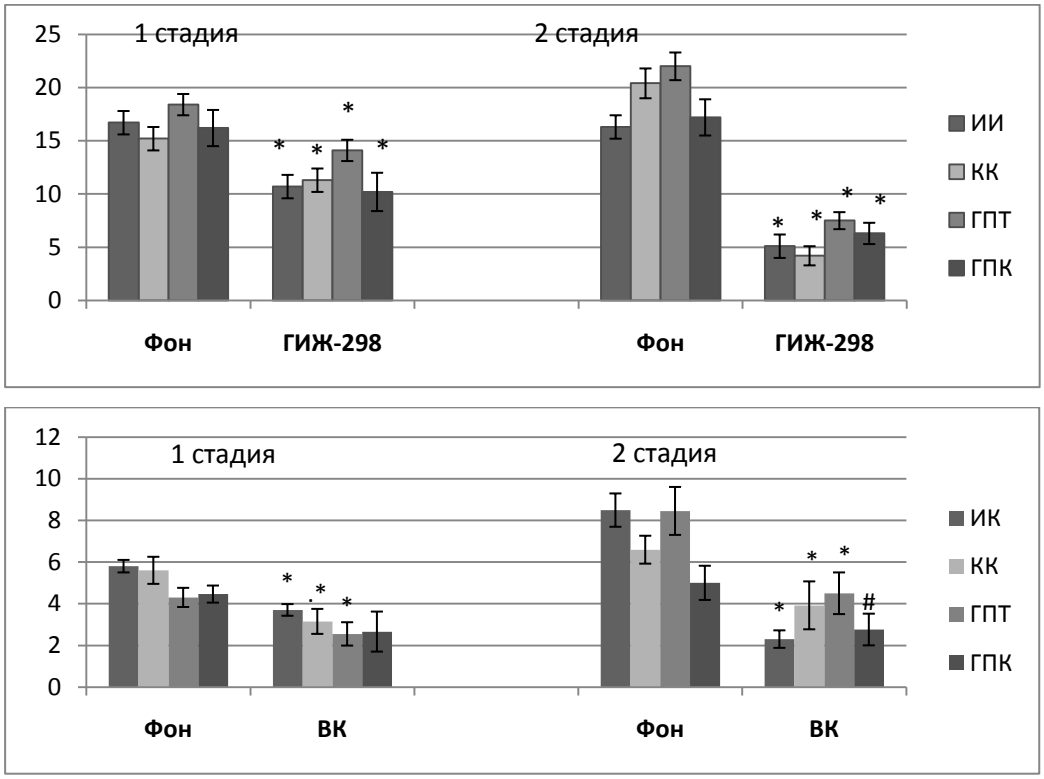
Изучение влияния ВК (вальпроевой кислоты) в дозе 200 мг/кг на эпилептиформную активность мозга крыс показало, что на 1-й стадии формирования Эпи системы через 1 и 2 часа после введения препарата число разрядов ЭпА (в среднем за минуту) и их длительность (в среднем за минуту) статистически достоверно снижались в электрокортикограммах ипси- (на 64%) и контрлатеральной коры (61%) и в гипоталамусе (на 59%), а также наблюдалось уменьшение средней длительности разрядов в гиппокампе. При этом, наибольшая выраженность эффекта (по снижению числа разрядов и их длительности) определялась в ипси-, контрлатеральной коре и гипоталамусе (рисунки 7, 8).

На 2-й стабильной стадии развития Эпи системы, по мере распространения ЭпА, наблюдалось формирование вторичных и третичных «зеркальных» и подкорковых эпилептических очагов. У крыс контрольных групп (фон) отмечалось формирование вторичного доминантного очага в контрлатеральной коре и гипоталамусе, что регистрировалось по увеличению числа разрядов и их длительности в этих структурах, при этом сохранялась высокая разрядная активность в ипсилатеральной коре. На данной стадии регистрации развития Эпи системы опережение в возникновении ЭпА отмечалось в контрлатеральной коре и гипоталамусе, что свидетельствует об изменении детерминантной структуры относительно 1-й стадии (рисунки 7, 8).

На 2-й стадии формирования Эпи системы соединение ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг вызывал значительное уменьшение числа и длительности Эпи разрядов во всех исследуемых структурах.

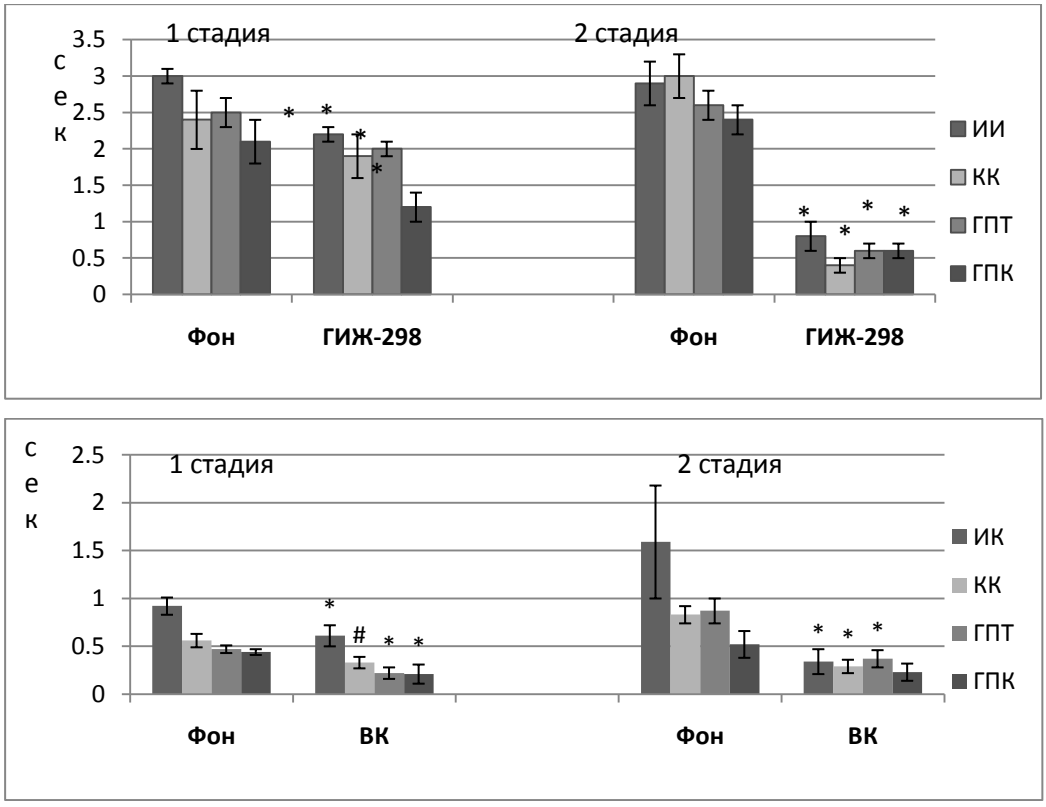
Эффект соединения наиболее отчетливо проявлялся в контрлатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе (рисунки 7, 8).

Через 2 часа после введения ВК в дозе 200 мг/кг отмечалось статистически достоверное уменьшение числа разрядов и их длительности в ипсилатеральной коре и гипоталамусе, в структурах с наибольшим количеством разрядов. Статистически достоверный противосудорожный эффект был также выражен в контрлатеральной коре и наблюдался по снижению (в 3,4 раза) средней длительности Эпи разряда. Анализ степени снижения показателей ЭпА в различных структурах мозга через 2 часа после введения ВК показал, что наиболее выраженное снижение числа разрядов (в 3,7 раз) и их длительности (в 4,5 раз) наблюдалось на стороне очага - в ипсилатерельной коре, а наименьшее – в гиппокампе (рисунки 7, 8).



Примечания: ИК – ипсилатеральная кора, КК – контрлатеральная кора, ГПК – гиппокамп, ГПТ – гипоталамус; по оси ординат – количество разрядов; * - достоверность отличий от группы контроля (фон) при $P \leq 0,05$ (парный критерий Стьюдента).

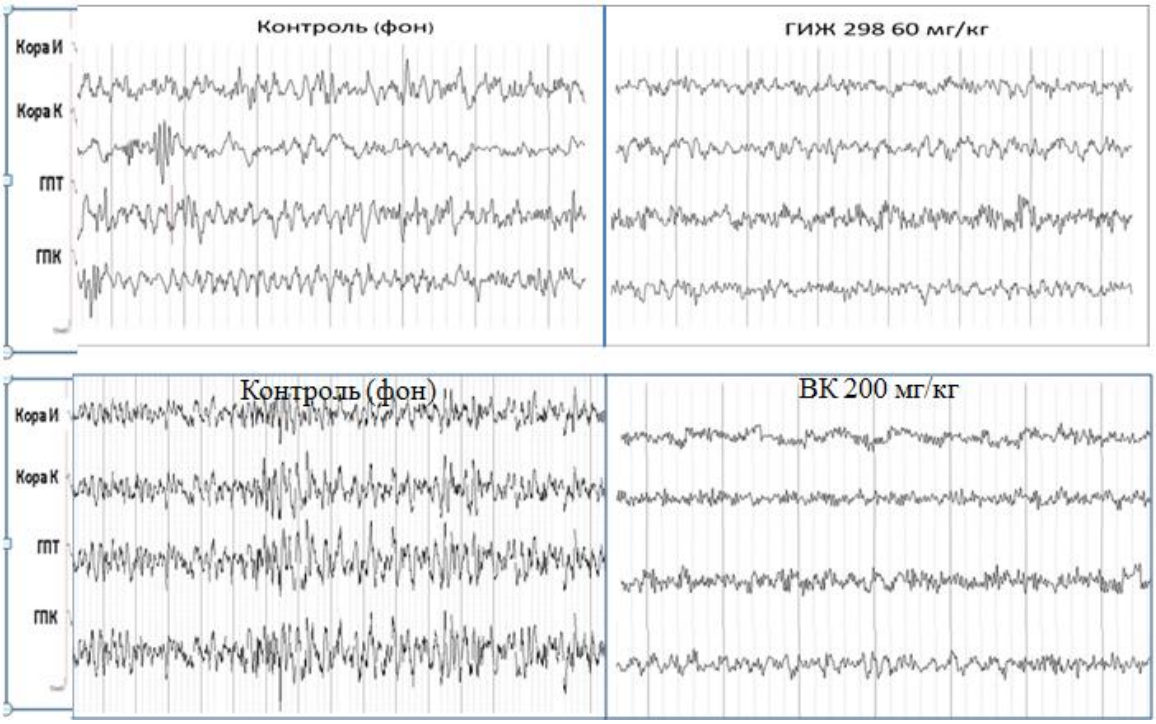
Рисунок 7 - Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) и вальпроевой кислоты (ВК, 200 мг/кг) на число судорожных разрядов за минуту на 1 и 2 стадиях формирования Эпи системы



Примечания: ИК – ипсилатеральная кора, КК –контрлатеральная кора, ГПК – гиппокамп, ГПТ – гипоталамус; по оси ординат – секунды, длительность разрядов; * - достоверность отличий от группы контроля (фон) при $P \leq 0{,}05$ (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 8 - Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) и вальпроевой кислоты (ВК, 200 мг/кг) на длительность судорожных разрядов (с) за минуту на 1й и 2й стадиях формирования Эпи системы

На примере ЭЭГ крыс 2й стадии развития Эпи системы, получавших ГИЖ-298 и ВК, показано, что соединения устраняли высокоамплитудные генерализованные полиспайки и уменьшали дезорганизацию биоэлектрической активности мозга крыс с кобальт-индуцированным Эпи очагом (рисунок 9).



Примечание: Кора И – ипсилатеральная кора, Кора К –контрлатеральная кора, ГПК – гиппокамп, ГПТ – гипоталамус.

Рисунок 9 – Примеры ЭЭГ крыс на 2 стадии развития Эпи системы, получивших ГИЖ-298 и вальпроевую кислоту (ВК)

Таким образом, в модели хронической эпилепсии показано, что ГИЖ-298 (60 мг/кг) по активности и выраженности эффекта превосходит ВК (200 мг/кг), что позволяет соединению в меньшей дозе и в большей степени подавлять очаги ЭпА, как в корковых, так и подкорковых структурах мозга.

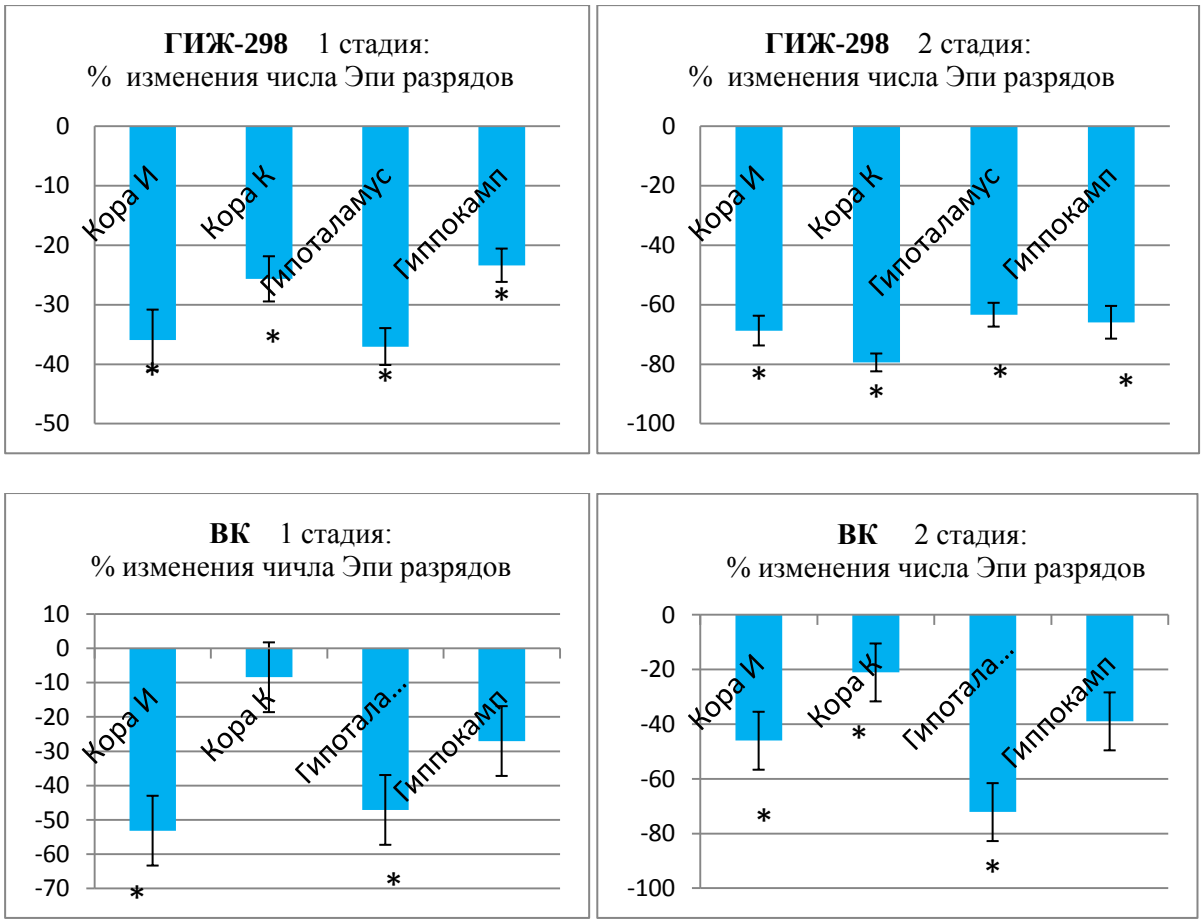
Выявление ЭЭГ мишеней (структуры мозга) действия соединения ГИЖ-298 в модели хронической кобальтовой эпилепсии

Выявление таргетных структур-мишеней действия ПЭП может способствовать оптимизации лечения эпилепсии. Структуры-мишени для соединения ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты (ВК) определяли с помощью программы «Brainsys» на двух стадиях развития Эпи системы у крыс с кобальт-индуцированным Эпи очагом, моделирование которого проводили согласно методическим рекомендациям (раздел «Материалы и методы»). Ведущую структурную «мишень» соединений определяли по наибольшему подавлению ЭпА (число и длительность разрядов).

Показано, что ГИЖ-298 (60 мг/кг) уменьшает число и длительность судорожных разрядов во всех структурах мозга как на 1, так и на 2 стадии формирования Эпи системы. Электрофизиологический механизм ГИЖ-298 на 1 стадии формирования Эпи системы

определяется влиянием на первичные очаги ЭпА в ипсилатеральной коре (на стороне аппликации кобальта) и в гипоталамусе, а на 2 стабильной стадии развития Эпи системы - влиянием на генерирующие ЭпА вторичные и третичные очаги в контрлатеральной коре («зеркальный» очаг), гиппокампе и гипоталамусе (рисунок 10).

Анализ степени снижения показателей ЭпА в различных структурах мозга под влиянием ВК (200 мг/кг) показал, что наиболее выраженное снижение числа и длительности разрядов наблюдалось на стороне очага - в ипсилатерельной коре и гипоталамусе как на 1, так и на 2 стадии развития Эпи системы, что и определяет структурные мишени препарата. Наименьшее влияние ВК оказала на гиппокамп (рисунок 10).



Примечание - *P ≤ 0,05 по сравнению с фоном (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 10 – Степень изменения (%) числа разрядов в различных структурах мозга у крыс с кобальт-индуцированным очагом под действием ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты (ВК) на 1 и 2 стадиях формирования Эпи системы

Таким образом, установлено что структурными мишенями противосудорожного действия для ГИЖ-298 на начальной стадии развития Эпи системы являются ипсилатеральная кора и гипоталамус, а на 2 стабильной стадии - контрлатеральная кора (зеркальный третичный очаг ЭпА), гиппокамп и гипоталамус, тогда как для вальпроевой

кислоты в качестве структуры-мишени выступают ипсилатеральная кора и гипоталамус как на 1й, так и 2й стадии развития Эпи системы.

4.2 Влияние соединения ГИЖ-298 в сравнении с вальпроевой кислотой на модели эпилептического статуса, вызванного нейротоксином гомоцистеина тиолоктоном

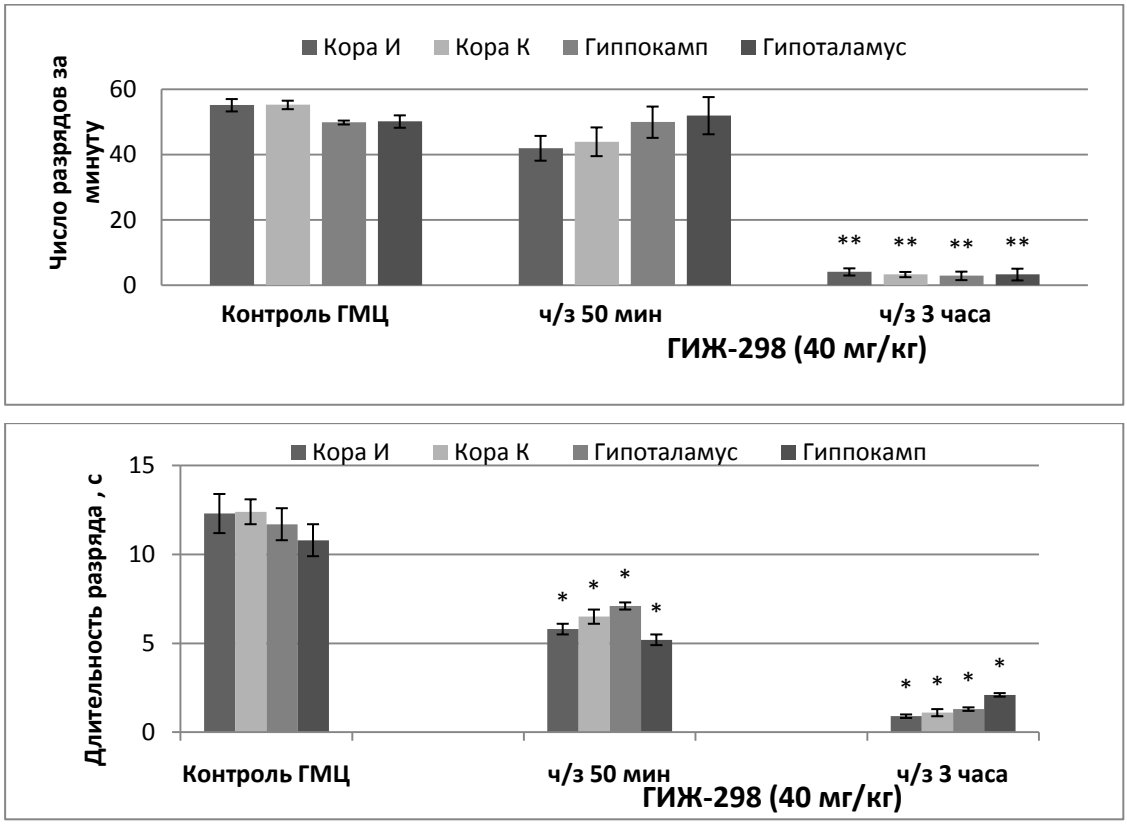
Для создания эпилептического статуса (Эпи статуса) у крыс сначала, с использованием кобальта создавали хронический, Эпи очаг по методике, описанной выше и затем, на 8 день крысам, со стабильной ЭпА вводили гомоцистеина тиолактон (ГМЦ) в дозе 5,5 ммоль/кг (в/б), что приводило к развитию Эпи статуса. Оценивали способность соединения устранять ЭЭГ (длительность и число разрядов) и моторные (фокальные подергивания, вторично генерализованные тонико-клонические судороги (ВГТКС)), проявления Эпи статуса и гибель животных. Препаратом сравнения была выбрана вальпроевая кислота, как препарат первой линии в лечение у пациентов с Эпи статусом.

У крыс с кобальтовым очагом ЭпА на 8 сутки (фон) после аппликации кобальта, наблюдалась высокая разрядная активность во всех исследуемых структурах мозга с количественным преимуществом в контрлатеральной коре и гиппокампе. После введения нейротоксина гомоцистеина тиолоктона (ГМЦ) у крыс наблюдалось усиление пароксизмальной активности на ЭЭГ во всех структурах мозга в 2,2 - 2,8 раза, которая нарастала до появления высокоамплитудных продолжительных (от 8 до 14 с) разрядов и появления ВГТКС (рисунки 11,12,13). ВГТКС характеризовались ЭЭГ пароксизмальной активностью (у 100 % крыс) и моторными проявлениями (у 100 % крыс), которые включали отдельные фокальные подергивания (у 100 % крыс), сложные моторные комплексные движения (у 100 % крыс), барабанный бой (у 67 % крыс) и боковое положение (у 50% крыс) (рисунок 14). Таким образом, клинико-поведенческие моторные проявления Эпи статуса сопровождались появлением характерных паттернов судорожной активности в электрограммах коры, гиппокампа и гипоталамуса.

Для оценки способности устранять развившийся эпилептический статус соединение ГИЖ-298 в дозах 40 и 60 мг/кг (в/б), ВК в дозе 200 мг/кг (в/б) и леветирацетам в дозе 200 мг/кг (в/б) вводили животным с развившимся электрографическим статусом. Способность вещества устранять эпилептический статус оценивали по уменьшению проявлений развернутого эпилептического приступа в электрограммах таких структур мозга, как ипси- и контрлатеральная кора, гиппокамп и гипоталамус и по моторно-поведенческим показателям (ВГТКС).

Соединение ГИЖ-298 в дозе 40 мг/кг через 3 часа статистически достоверно уменьшало Эпи разряды на ЭЭГ в ипси- и контрлатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе (рисунок

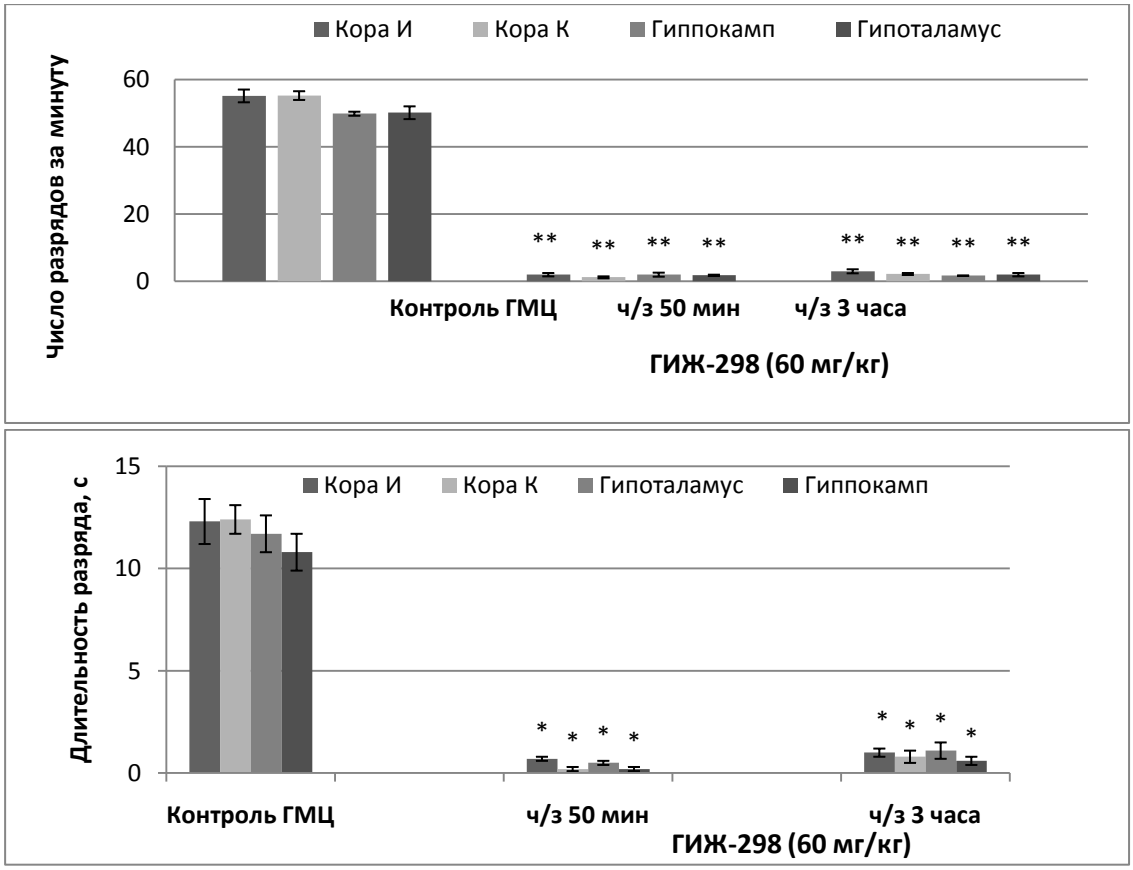
11), а также моторно-поведенческие проявления Эпи статуса, такие как генерализованные клонические комплексные движения, вставание на задние лапы («барабанный бой»).



Примечание: ГМЦ – гомоцистеина тиолактон; Кора И – ипсилатеральная кора, Кора К – контрлатеральная кора; * - достоверность отличий от контрольных показателей, при $P \leq 0.05$; ** - при $P \leq 0{,}01$ (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 11 – Влияние ГИЖ-298 (40 мг/кг) на число и длительность судорожных разрядов в структурах мозга крыс на модели Эпи статуса

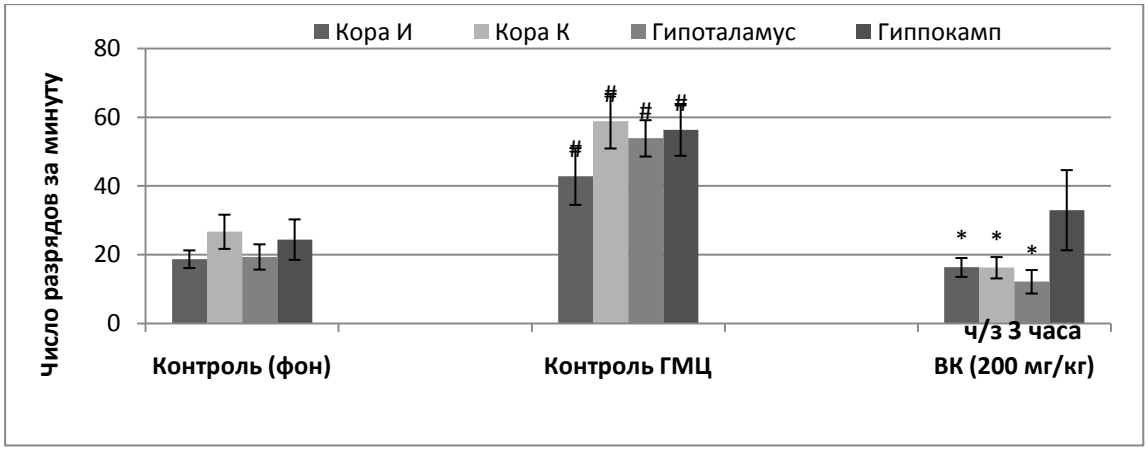
В дозе 60 мг/кг ГИЖ-298 полностью устраняет Эпи разряды на ЭЭГ в ипси- и контрлатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе через 50 минут после введения, что сопровождается полным подавлением разрядной активности и восстановлением биоэлектрической активности структур мозга, а также 100% защитой от гибели (рисунки 12, 14).

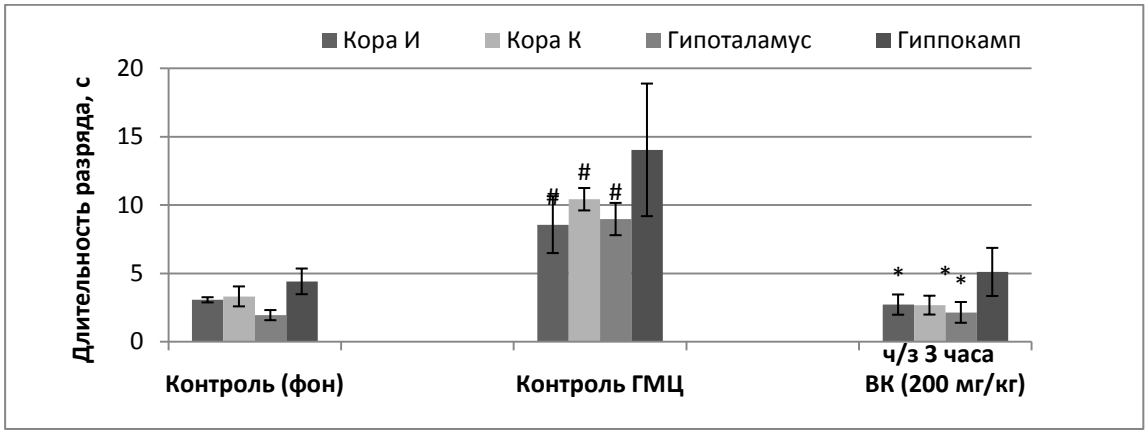


Примечание: ГМЦ – гомоцистеина тиолактон; Кора И – ипсилатеральная кора, Кора К – контрлатеральная кора; * - достоверность отличий от контрольных показателей с ГМЦ, при $P \leq 0.05$; ** - при $P \leq 0{,}01$ (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 12 - Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на число и длительность судорожных разрядов в структурах мозга крыс на модели Эпи статуса

ВК (200 мг/кг) устраняла ЭпА у крыс с кобальт-индуцированным очагом через 3 часа после введения препарата, что выражалось в снижении числа Эпи разрядов и их длительности во всех исследуемых структурах мозга, кроме гиппокампа. Снижение количества и длительности разрядов в контрлатеральной коре и гипоталамусе было наиболее значимым и ниже уровня фоновых значений, регистрируемых до введения ГМЦ. Регистрировалось практически полное исчезновение ЭпА, характерной для эпистатуса, однако, с сохранением повышенной разрядной активности в гиппокампе (рисунок 13).



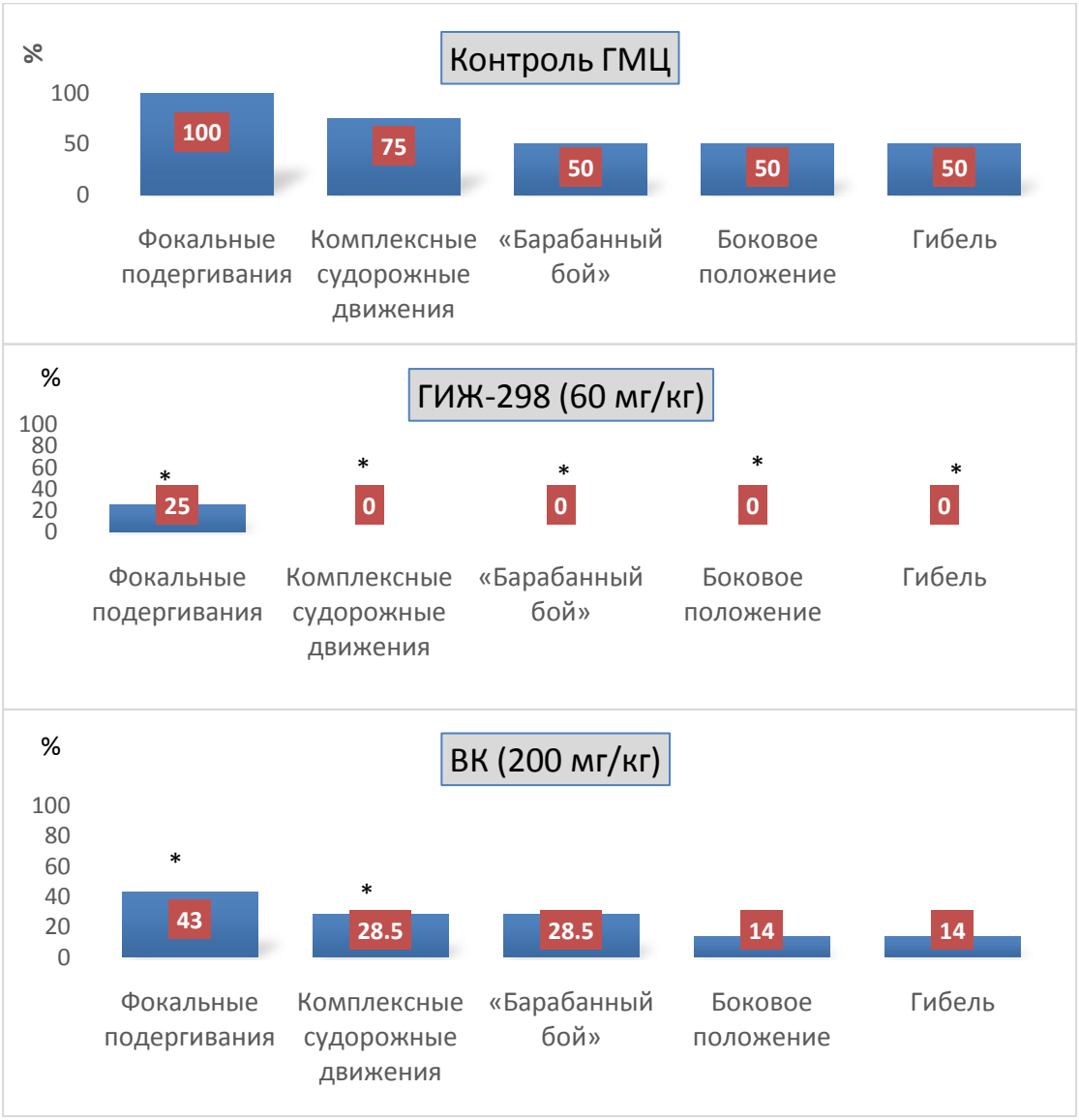


Примечание: ГМЦ – гомоцистеина тиолактон; Кора И – ипсилатеральная кора, Кора К – контрлатеральная кора; # - достоверность отличий от фоновых показателей, при $P \leq 0.05$; * - достоверность отличий от контрольных показателей с ГМЦ, при $P \leq 0.05$ (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 13 – Влияние вальпроевой кислоты (ВК, 200 мг/кг) на число и длительность судорожных разрядов в структурах мозга крыс на модели Эпи статуса

Соединение ГИЖ-298 в дозе 40 и 60 мг/кг полностью устраняет моторные проявления Эпи статуса, которые выявляются в 100% случаев контрольной группы крыс. В контрольной группе крыс ВГТКС начинаются с отдельных фокальных подергиваний у 100 % крыс, которые переходят в сложные моторные комплексные движения (у 75 %) и завершаются, запрокидыванием головы, барабанным боем и гибелью животного (у 50% животных). Полное исчезновение ВГТКС наблюдается через 50 минут после введения ГИЖ-298. Соединение уменьшает фокальные подергивания до 25 %, полностью устраняет сложные моторные комплексные движения, барабанный бой и боковое положение, а также полностью защищает от гибели (рисунки 14,15).

ВК в дозе 200 мг/кг через 3 часа устраняла моторные проявления Эпи статуса у 67% крыс. Исчезновение ВГТКС сопровождалось снижением количества крыс с фокальными подергиваниями (до 43 %), со сложными моторными комплексными движениями и «барабанным боем» (до 28,5%) (рисунки 14,15).

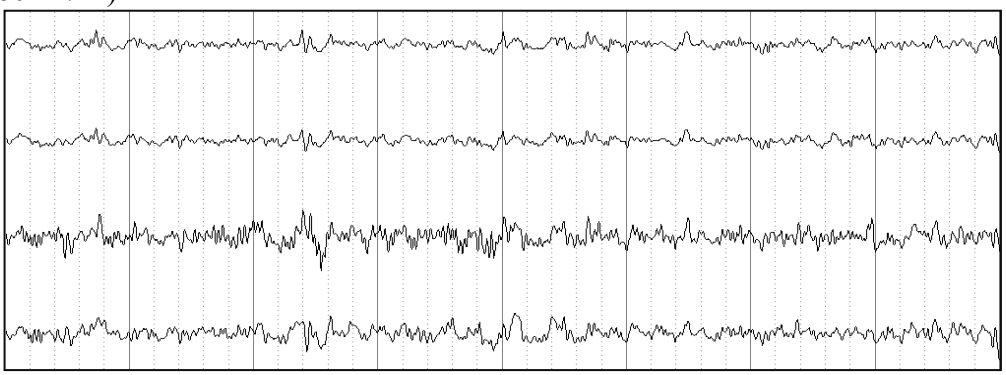


Примечание - * - достоверность отличий от контрольных показателей после введения ГМЦ (гомоцистеина тиолактон), при $P \leq 0.05$ (точный критерий Фишера).

Рисунок 14 – Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) и вальпроевой кислоты (ВК, 200 мг/кг) на моторные проявления Эпи статуса, вызванного ГМЦ

ГМЦ (развернутый Эпи статус)

ГИЖ-298 (60 мг/кг)



ВК (200 мг/кг)

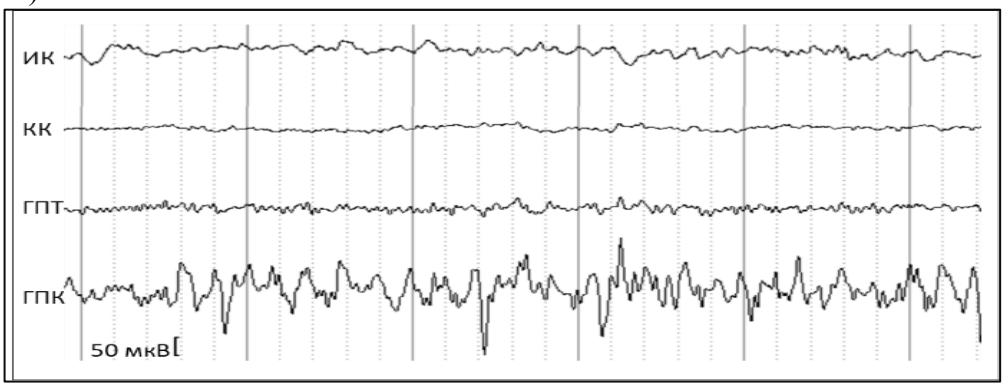


Рисунок 15 – Пример ЭЭГ крыс после введения ГИЖ-298 (60 мг/кг) и вальпроевой кислоты (ВК, 200 мг/кг) на фоне развернутого Эпи статуса, вызванного ГМЦ

Таким образом, ГИЖ-298 через 50 минут после введения полностью устраняет ЭЭГ и моторные проявления Эпи Статуса (комплексные генерализованные клонические реакции), индуцированные ГМЦ, а также гибель животных (в контроле – гибель 50%). ГИЖ-298 превосходит по активности и эффективности ВК: при использовании ВК противосудорожный эффект развивался только через 3 часа и оставались животные с моторными нарушениями, а также регистрировалась гибель животных.

4.3 Изучение противосудорожного действия соединения ГИЖ-298, вальпроевой кислоты на модели аудиогенных судорог у крыс Крушинского-Молодкиной

Крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ) подвергались воздействию аудиогенного раздражителя (120 Дб) в звонковой камере.

У крыс КМ после звука развивались клонические припадки, которые начинались коротким и интенсивным бегом, фазой «дикого бега». Через несколько секунд после двигательной волны (ДВ) развивались клонические судороги с запрокидыванием головы и тонико-клонические судороги с экстензией конечностей у 83%. Максимальная выраженность судорог составляла 3,73 балла (таблица 16).

Соединение ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг полностью устраняет тоническую экстензию передних и задних конечностей при этом приступ появляется только после второй волны двигательного возбуждения, отличие от контроля с одноволновой реакцией. При этом у животных полностью подавлялась фаза тонических судорог (таблица 16).

Использование вальпроевой кислоты (ВК) в дозе 100 мг/кг выявила высокую эффективность препарата в тесте аудиогенных судорог у крыс КМ (таблица 16).

Таблица 16 – Влияние соединения ГИЖ-298 на аудиогенные судороги у крыс КМ

Группа животных	Выраженность судорог в баллах	Количество ДВ	% крыс с тонической экстензией конечностей
Контроль	3,73±0,27	1 (1÷1)	83
ГИЖ-298 (60 мг/кг)	1,05±0,14**	2 (2÷2)&	0#
ВК (100 мг/кг)	0,95±0,18**	2 (2÷2)&	0#

Примечания*:* ДВ – двигательная волна; ** - достоверность отличий при $P \leq 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета); & – при $P \leq 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса); # – при $P \leq 0,05$ (точный критерий Фишера); балл 0 – отсутствие ДВ на звук, балл 1 – ДВ, балл 2 – клонус всего тела, балл 3 – клонико-тонические судороги (на боку), балл 4 – тонические судороги с остановкой дыхания.

Таким образом, по выраженности эффекта в тесте аудиогенных судорог и крыс КМ соединение ГИЖ-298 (60 мг/кг) не уступает вальпроевой кислоте (ВК, 100 мг/кг).

4.4 Нейропсихотропные эффекты соединения ГИЖ-298

Целью данного раздела исследования было выявить спектр нейропсихотропных эффектов соединения ГИЖ-298 (производного 4-бензопиридина). ГИЖ-298 и препараты сравнения изучали в поведенческих тестах, включающих оценку когнитивных функций (тест Y-лабиринт), депрессивно-подобных расстройств (тест Порсолт, тест подвешивания за хвост) и

тревожного состояния (тест ПКЛ), описание которых изложено в разделе «Материалы и методы».

При изучении нейропсихотропных эффектов в работе использованы белые беспородные мыши самцы, массой 22-25 г. ГИЖ-298 вводили в дозах 20, 40 и 60 мг/кг (в/б).

Оценка анксиолитических свойств ГИЖ-298 у мышей в тесте ПКЛ

В тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) на мышах оценивали в течение 5 минут время и количество заходов в светлые рукава лабиринта.

ГИЖ-298 (40 мг/кг) при 7 дневном введении в методике ПКЛ у мышей оказывал выраженный анксиолитический эффект, увеличивая число заходов (в 2 раза) и время (в 2,5 раза), проведенное в светлых рукавах установки. В дозе 20 мг/кг отмечалось также увеличение данных показателей, однако эти значения не достигли статистической достоверности (таблица 17).

ВК (150 мг/кг/7дней) оказывала анксиолитический эффект у мышей, увеличивая в 4 раза время, проведенное в светлых рукавах лабиринта, однако препарат не влиял на число заходов в открытые рукава лабиринта. При этом увеличивался латентный период первого захода в рукав, что, возможно, связано с седативным эффектом, которое не наблюдается при применении ГИЖ-298 и леветирацетама (таблица 17).

Таблица 17 – Изучение анксиолитических свойств ГИЖ-298 в сравнение с ВК в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ), Mean ± SEM

Группа животных, доза	ЛП, с	Кол-во пере-ходов в закрытые рукава	Время в закрытых рукавах, с	Кол-во пере-ходов в откры-тые рукава	Время в открытых рукавах, с	Общее кол-во пере-ходов
Контроль	1,4 ± 0,6	18,3 ± 1,7	187,4 ± 17,4	5,6 ± 1,3	31,0 ± 9,4	23,9 ± 2,6
ГИЖ-298, 20 мг/кг	1,6 ± 0,6	15,0 ± 1,1	156,8 ± 9,0	7,0 ± 0,8	45,5 ± 5,2	22,0 ± 1,7
ГИЖ-298, 40 мг/кг	3,3 ± 0,9	17,0 ± 1,58	137,2 ± 14,5$^{\&}$	11,1 ± 1,3$^{\&\&}$	81,0 ± 9,8**	26,9 ± 3,0
Контроль	4,7± 1,9	7,2±0,6	159,9±18,4	2,3±0,6	38,6±17,7	9,5± 1,1
ВК, 150 мг/кг	25,0± 4,6**	4,6±1,3	91,4±15,5*	2,4±0,5	150,7±30,4 **	7,0± 1,3

Примечания - * – P≤0,05 и ** – P≤0,01 достоверность отличий по сравнению с контролем (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета); ВК – вальпроевая кислота.

Влияние ГИЖ-298 на когнитивные функции мышей в тесте Y-образный лабиринт

Тест У-образный лабиринт проводили на мышах. В течение 5 минут оценивали количество правильных чередований рукавов лабиринта. ГИЖ-298 и ВК вводили однократно за 30 минут до начала эксперимента, а в последующем эксперименте в течение 14 дней и за 30 мин до начала эксперимента

В контрольной группе мышей процент правильного чередования рукавов, критерий отражающий функцию кратковременной памяти, составил 55 % в среднем за 14,8 посещений, совершенных за 5 минут наблюдения (таблица 18).

При изучении влияния на когнитивные функции установлено, что умственная работоспособность животных, получивших однократно ГИЖ-298 (60 мг/кг) не отличалась от умственной работоспособности контрольных мышей. ГИЖ-298 не нарушает кратковременную память у мышей в тесте Y-образного лабиринта при однократном и многократном режимах введения: процент правильных чередований рукавов не отличался от значений контрольной группы при однократном введении ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг и при курсовом (14 дней) введении в дозах 20 и 40 мг/кг (таблица 18).

Исследование поведения мышей в Y-образном лабиринте, получивших ВК (100 мг/кг, однократно), не выявило по сравнению с контрольными значениями достоверных изменений показателей (таблица 18).

Таблица 18 – Влияние ГИЖ-298 в сравнение с ВК на когнитивные функции мышей в тесте Y-лабиринта

Группа животных	Доза, мг/кг	% правильных чередований	Количество входов в рукава
Однократно			
Контроль	-	55,0 ± 2,9	14,8 ± 3,8
ГИЖ-298	60	46,6 ± 6,3	17,2 ± 2,7
ВК	100	50,6 ± 6,1	24,2 ± 2,6
Контроль	-	79,6 ± 10,4	23,2 ± 2,1
Курс 14 суток			
Контроль	-	46,05 ± 6,92	9,20 ± 1,40
ГИЖ-298	20	48,51 ± 6,09	9,27 ± 1,22
	40	47,2±10,6	8,9±1,5

Влияние ГИЖ-298 на депрессивно-подобное поведение мышей в тесте по Порсолту

Тест вынужденного плавания по Порсолту проводили на мышах в цилиндрах наполненных водой, t=23-24^{0}C. В течение 6 минут оценивали время иммобилизации животных (периодов замирания). В тесте подвешивания за хвост мышь за середину хвоста при помощи

лейкопластыря подвешивали на перекладину, находящуюся на высоте. Показателем депрессивноподобного состояния в обоих тестах являлась сумма эпизодов иммобилизации животного, а критерием антидепрессивной активности веществ - уменьшение суммарной длительности иммобилизации. Вещества (ГИЖ-298 и амитриптилин) вводили однократно и в течение 14 дней.

В тесте вынужденного плавания по Порсолту установлено, что ГИЖ-298 в дозах 20 и 40 мг/кг (в/б) при курсовом введении (14 дней) не влияет на депрессивно-подобоное поведение мышей, в отличие от препарата сравнения амитриптилина, который значительно снижал время иммобилизации мышей (таблица 19).

В тесте подвешивания за хвост ГИЖ-298 в дозах 20 и 40 мг/кг (курс 14 дней) не вызывал достоверного изменения времени иммобилизации по сравнению с контролем, тогда как амитриптилин (10 мг/кг, курс 14 дней) вызывал значительное (в 3 раза) уменьшение времени иммобилизации мышей (Таблица 19).

Таблица 19 – Изучение антидепрессивных свойств ГИЖ-298 в сравнение с амитриптилином в тестах вынужденного плавания по Порсолту и подвешивания мышей за хвост при курсовом введении (14 дней), Mean ± SEM

Группа животных	Доза, мг/кг	Время иммобилизации, с
Тест вынужденного плавания по Порсолту		
Контроль	-	125,8 ± 19,7
ГИЖ-298	20	101,9 ±20,8
	40,0	146,3 ± 11,8
Амитриптилин	10	10,4 ± 4,6*
Тест подвешивания за хвост		
Контроль	-	128,4 ± 2,8
ГИЖ-298	20	132,9 ± 6,0
ГИЖ-298	40,0	119 ± 6,6
Амитриптилин	10	41,7 ± 6,2*

Примечание - *- достоверность отличий от контроля, при $P \leq 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии у соединения ГИЖ-298 антидепрессивной активности в тестах вынужденного плавания по Порсолту и подвешивания за хвост, в противоположность амитриптилину, оказывающему выраженное антидепрессивное действие в обоих тестах.

Заключение

На модели хронической очаговой эпилепсии, индуцированной нанесением кобальта на сенсомоторную зону коры, соединение ГИЖ-298 (60 мг/кг) уменьшает (в 5 и более раз) число как первично-, так и вторично генерализованных судорожных разрядов и их длительность в ипси- и контрлатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе. Установлено, что на стадии формирования Эпи системы структурными мишенями действия соединения ГИЖ-298 являются Эпи-очаги в ипсилатеральной сенсомоторной коре и гипоталамусе, а на стадии стабилизации Эпи системы эффект соединения направлен на доминирующие очаги Эпи активности в контрлатеральной сенсомоторной коре, гиппокампе и гипоталамусе.

ГИЖ-298 уже через 50 минут после введения, в отличие от вальпроевой кислоты, полностью устраняет ЭЭГ и моторные проявления Эпи Статуса (комплексные генерализованные клонические реакции), индуцированные нейротоксином ГМЦ, а также гибель животных. ГИЖ-298 превосходит по активности и эффективности ВК, в группе которой эффект развивался только через 3 часа и оставались животные с моторными нарушениями, также регистрировалась гибель.

В хронической генетически детерминированной модели аудиогенной эпилепсии, у крыс линии Крушинского-Молодкиной соединение ГИЖ-298 устраняет тонико-клонические судороги, вызванные акустическим раздражителем. По выраженности эффекта ГИЖ-298 не уступает вальпроевой кислоте.

Установлено, что ГИЖ-298, также как и вальпроевая кислота, оказывает позитивное влияние на эмоциональное поведение, в частности на тревогу, которая является одним из основных коморбидных расстройств у больных эпилепсией. ГИЖ-298 не нарушает когнитивные функции при однократном и курсовом введениях (14 дней) в тесте Y-образного лабиринта. Полученные данные на мышах в тестах вынужденного плавания по Порсолту и подвешивания за хвост свидетельствуют об отсутствии у соединения ГИЖ-298 антидепрессивной активности.

Таким образом, ГИЖ-298 оказывает влияние на структуры мозга, играющие ключевую роль, как в развитии судорожных припадков, так и в изменении эмоционального поведения.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:

Воронина Т.А. Противосудорожное действие производного 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298) на пароксизмальную активность в структурах мозга крыс с кобальт-индуцированной очаговой эпилепсией на первой стадии формирования эпилептической системы [Текст] / Воронина Т.А., Гайдуков И.О., ***Литвинова С.А.,*** *Неробкова Л.Н., Жмуренко Л.А. // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. - №2.- С.37-39 [8].*

*Литвинова С.А. Изучение электрофизиологических и нейрохимических механизмов противосудорожных эффектов нового оригинального соединения ГИЖ298 [Текст] / **Литвинова С.А.,** Воронина Т.А., Кудрин В.С., Гайдуков И.О., Неробкова Л.Н., Писклова М.В., Авакян Г.Г., Жмуренко Л.А. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2016. – Т. 8, №3. – С. 19-26 [56].*

*Гайдуков И.О. Исследование противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298) и вальпроевой кислоты на модели эпилептического статуса у крыс с кобальт-индуцированным очагом [Текст] / Гайдуков И.О., **Литвинова С.А.,** Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Авакян Г. Г., Кутепова И.С. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2017. – Т. 9, № 2. - С. 57-66 [17].*

*Литвинова С.А. Сравнение эффектов и электрофизиологических механизмов действия вальпроевой кислоты и леветирацетама на экспериментальной модели очаговой эпилепсии [Текст] / **Литвинова С.А.,** Авакян Г.Г., Воронина Т.А., Гайдуков И.О., Неробкова Л.Н., Кутепова И.С., Авакян Г.Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии.- 2018. - Том 12, № 3. - С.45-52 [58].*

*Литвинова С.А. Влияние лакосамида на эпилептиформную активность и динамику структурно-функциональных связей эпилептической системы крыс с хронической фокальной эпилепсией [Текст] / **Литвинова С.А.,** Авакян Г.Г., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Гладышева Н.А. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2019 г., Том 11, №1, стр. 37-46 [61].*

*Гайдуков И.О. Влияние нового производного оксима 4-бензоилпиридина - ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты на тревожное и депрессивно-подобное состояния, когнитивные функции в эксперименте [Текст] / Гайдуков И.О., **Литвинова С.А.**, Воронина Т.А., Гладышева Н.А., Волкова А.В. // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2022. - Т.85, №7. - С. 8-12 [20].*

Глава 5 Изучение эффектов соединения-лидера из ряда 4-фенилпирролидона (ГИЖ-290) на ЭпА мозга на разных этапах формирования Эпи системы и изучение особенностей спектра его противоэпилептических и нейропсихотропных эффектов в сравнении с леветирацетамом.

Исследование соединения ГИЖ-290 проводили в сравнении со структурным аналогом из ряда пирролидонов леветирацетамом. Особенности спектра и механизм (ЭЭГ) противосудорожного эффекта ГИЖ-290 изучали на хронической кобальт-индуцированной модели эпилепсии, а также в модели пилокарпиновой и/или литий-пилокарпиновой эпилепсии, как наиболее специфичной модели для оценки эффектов препарата сравнения леветирацетама. Изучали ГИЖ-290 в модели первично-генерализованных судорог, вызванных бемегридом (анатагонистом барбитурового сайта $ГАМК_А$ – рецепторов).

5.1 Исследование влияния ГИЖ-290 в условиях модели хронической фокальной (парциальной) эпилепсии, индуцированной кобальтом

Исследования проводили на белых беспородных крысах самцах, массой 250-300 г. С помощью стереотаксиса в структуры мозга (двигательная зона коры левого и правого полушарий, дорзальный отдел гиппокампа, латеральные ядра гипоталамуса) вживлялись хронические электроды. Эпилептогенный очаг, индуцированный кобальтом, создавался на поверхности двигательной области коры левого полушария по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». Подсчитывались маркеры Эпи активности (число и длительность (сек) Эпи разрядов за минуту) в структурах мозга с выявлением доминантного очага на первой ранней (через 48 ч после создания очага) и второй, стабильной (через 5-6 дней после создания очага) стадиях формирования Эпи системы. Изучение влияния соединения ГИЖ-290 (5 мг/кг) на эпилептическую активность крыс с кобальтовой эпилепсией проводили в сравнении с леветирацетамом (200 и 500 мг/кг).

Фоновая запись ЭЭГ (контроль) крыс на 1й стадии развития Эпи системы показала, что через 48 часов после аппликации кобальта разряды ЭпА выявлялись во всех исследуемых структурах и характеризовались единичными острыми высокоамплитудными волнами, пиками, а также синхронно возникающими пароксизмальными разрядами (рисунок 16,17).

Соединение ГИЖ-290 в дозе 5 мг/кг через 1 час после его введения на 1-й стадии формирования эпилептической системы не оказывало влияния на пароксизмальную активность крыс, индуцированную кобальтом, что регистрировалось по отсутствию изменений, по сравнению с контролем, в числе и длительности разрядов ЭпА во всех исследуемых структурах (ипси- и контралатеральной коре, гипоталамусе и гиппокампе) (рисунок 16,17).

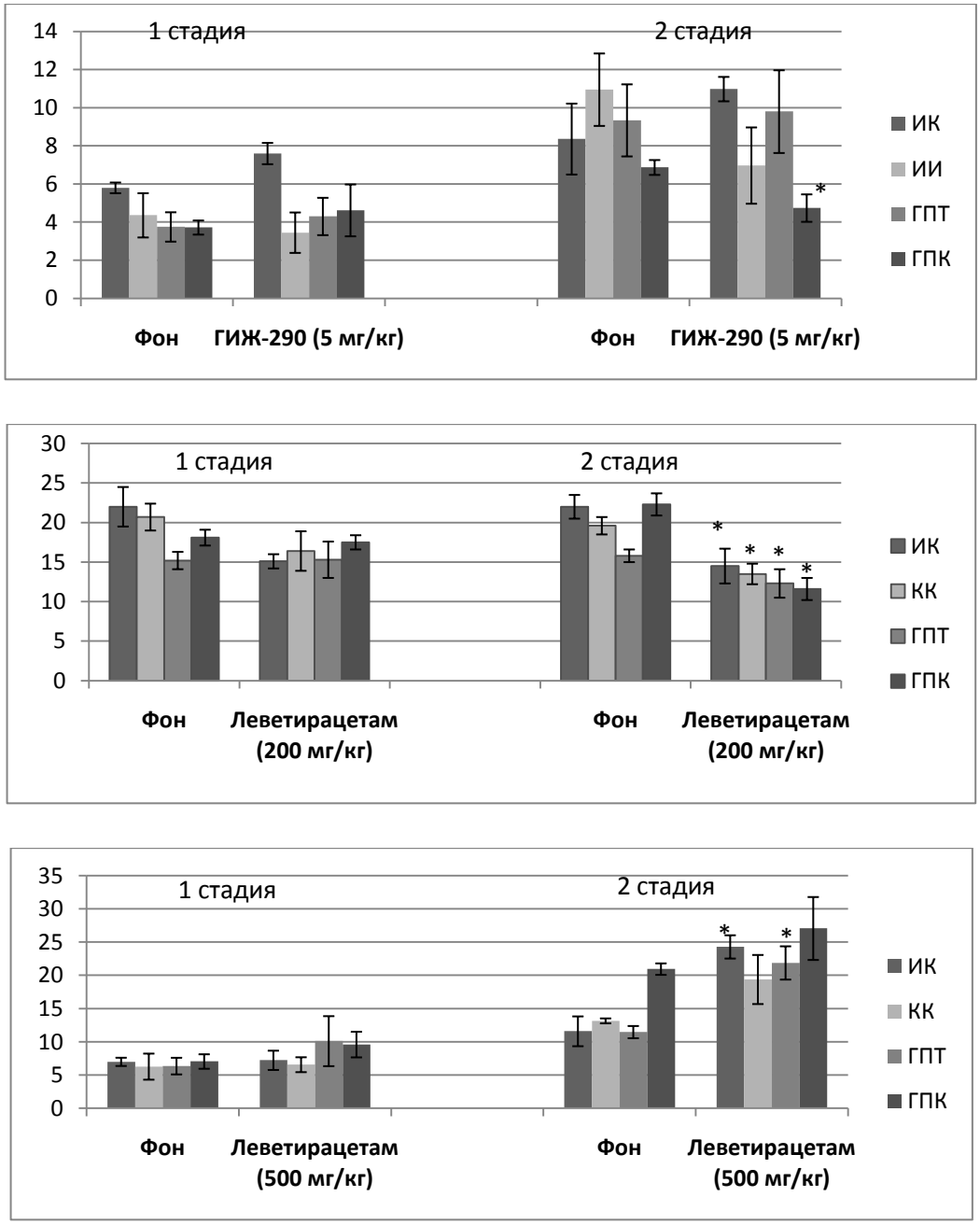
Изучение влияние леветирацетама в дозе 200 мг/кг на ЭпА мозга крыс показало, что на 1й стадии формирования эпилептической системы через 1 час после введения препарата число и длительность разрядов ЭпА значимо не изменялись относительно контрольных (фоновых) значений, однако вектор изменений был направлен в сторону снижения (рисунки 16,17). Леветирацетам в дозе 500 мг/кг через 1 час после введения также как и в дозе 200 мг/кг статистически значимо не изменял показатели ЭпА (рисунки 16,17).

На 2-й стадии развития Эпи системы (5-6 день после аппликации кобальта) в контроле (фоновая запись) у крыс отмечалось затухание первичного очага, регистрируемое по уменьшению числа разрядов и их длительности в электрограмма ипсилатеральной коры, и формирование вторичных и третичных очагов, регистрируемых по увеличению числа разрядов и их длительности в электрограммах контралатеральной коры и гиппокампа (рисунки 16,17).

На 2й стадии развития Эпи системы через 1 час после введения соединения ГИЖ-290 наблюдалось уменьшение числа и длительности разрядов ЭпА в гиппокампе. Однако, ГИЖ-290 не оказывал статистически достоверного влияния на ЭпА в других исследуемых структурах мозга (ипси- и контрлатеральной коре, гипоталамусе), при этом вектор изменений ЭпА был направлен в сторону снижения, особенно в контрлатеральной коре (рисунки 16,17).

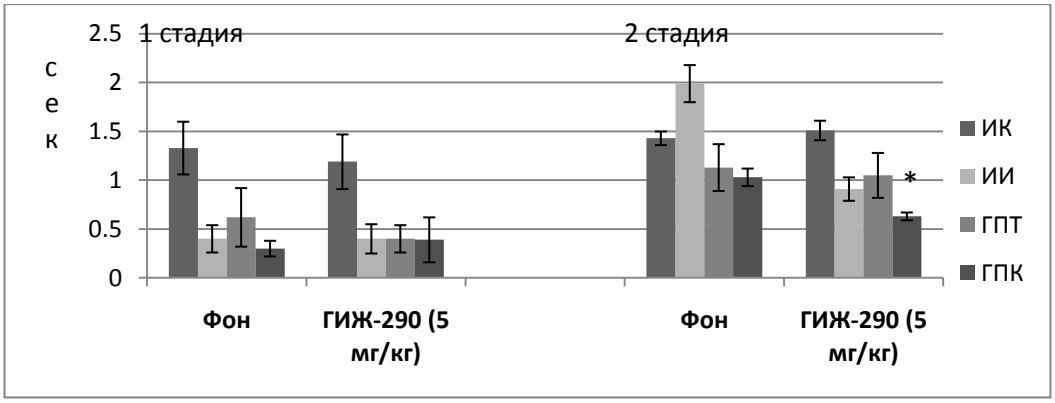
На 2-й стадии развития Эпи системы при введении леветирацетама в дозе 200 мг/кг наблюдалось снижение числа Эпи разрядов в корковых структурах и гиппокампе, а также их длительности во всех исследуемых структурах мозга. Наиболее выраженное действие препарат оказывал на гиппокамп, максимально снижая в данной структуре число разрядов (в 1,9 раза) и их длительность (в 2,5 раза). Наименьшее влияние препарат оказывал на гипоталамус (рисунки 16,17).

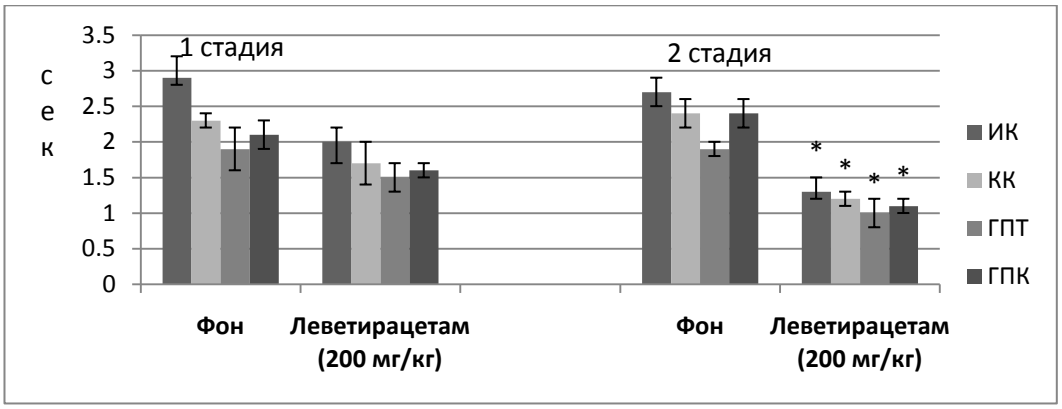
Через 1 час после введения леветирацетама в дозе 500 мг/кг на 2-й стадии формирования Эпи системы наблюдалось увеличение числа разрядов ЭпА во всех исследуемых структурах мозга, достигшее статистической достоверности в ипсилатеральной коре (на стороне аппликации кобальта) и в гипоталамусе (рисунки 16,17).

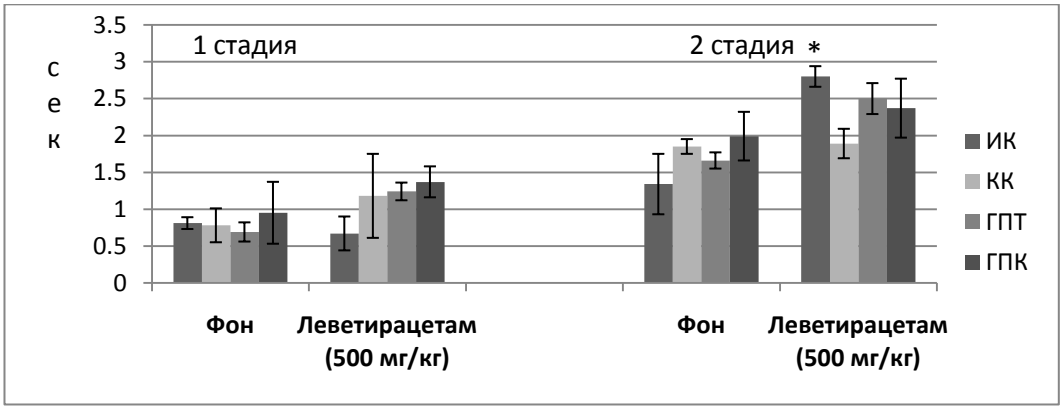


Примечания: ИК – ипсилатеральная кора, КК – контрлатеральная кора, ГПК – гиппокамп, ГПТ – гипоталамус; по оси ординат – количество разрядов * - достоверность отличий от группы контроля (фон), при $P \leq 0{,}05$ (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 16 - Влияние ГИЖ-290 (5 мг/кг) и леветирацетама (200 и 500 мг/кг) на число судорожных разрядов за минуту на 1 и 2 стадиях формирования Эпи системы



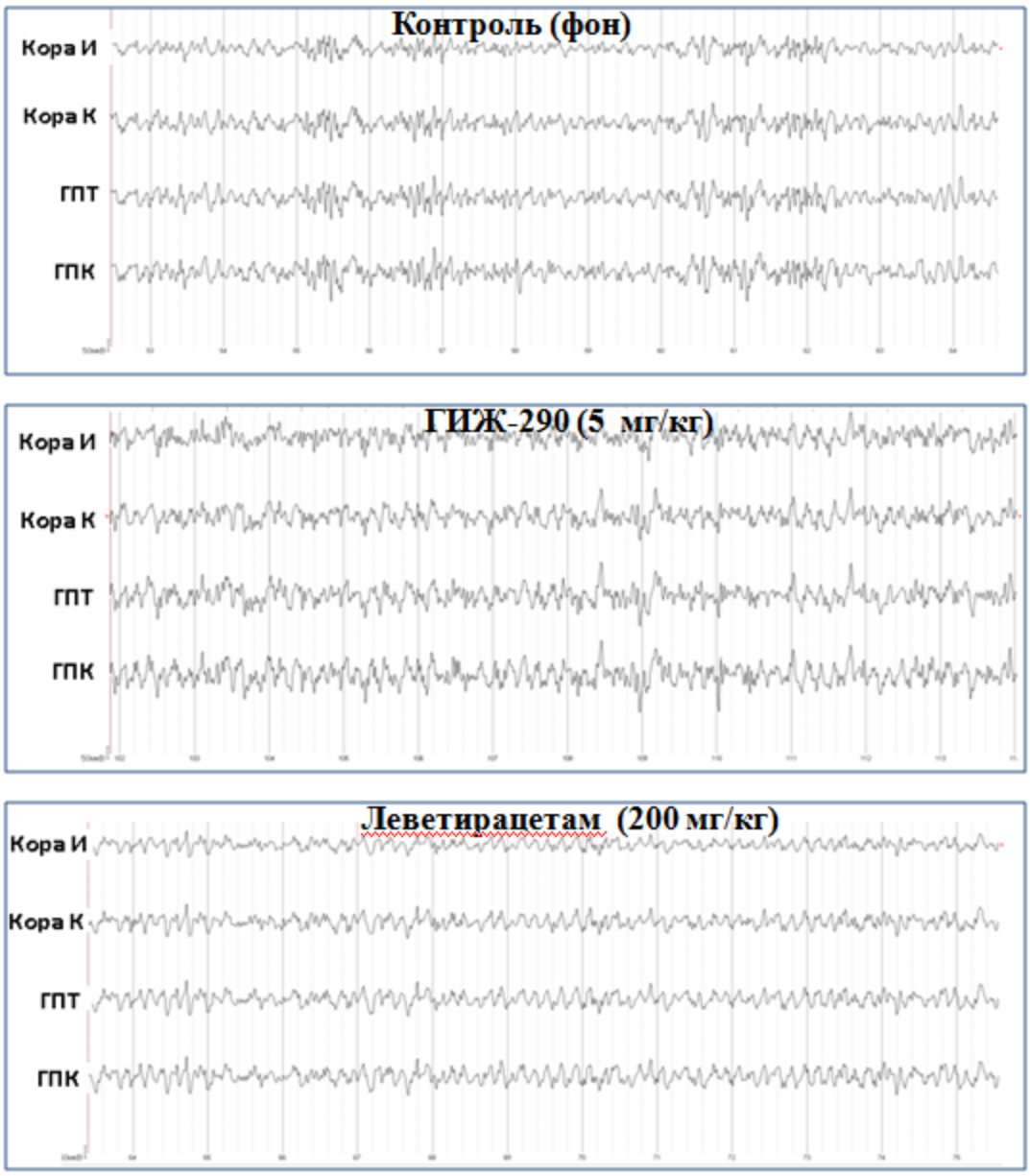




Примечание: ИК – ипсилатеральная кора, КК – контрлатеральная кора, ГПК – гиппокамп, ГПТ – гипоталамус; по оси ординат – секунды, длительность разрядов * - достоверность отличий от группы контроля (фон), при $P \leq 0,05$ (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 17 - Влияние ГИЖ-290 (5мг/кг) и леветирацетама (200 мг/кг) на длительность судорожных разрядов за минуту на 1 и 2 стадиях формирования Эпи системы

На рисунке 18 показан пример записи ЭЭГ крыс на 2й стадии развития Эпи системы, получавших ГИЖ-290 (5 мг/кг) и леветирацетам (200 мг/кг). Леветирацетам и в меньшей степени ГИЖ-290 способствовали устранению генерализованных полиспайков и уменьшали дезорганизацию биоэлектрической активности мозга крыс с кобальт-индуцированным Эпи очагом.



Примечание: Кора И – ипсилатеральная кора, Кора К - контрлатеральная кора, ГПТ– гипоталамус, ГПК – гиппокамп.

Рисунок 18 - Влияние ГИЖ-290 (5 мг/кг) и леветирацетама (200 мг/кг) на биоэлектрическую активность мозга крысы с кобальт-индуцированной эпилепсией на 2й стадии развития Эпи системы

Таким образом, на модели хронической фокальной (парциальной) эпилепсии, индуцированной аппликацией кобальта, установлено, что ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б) уменьшает число разрядов и их длительность в гиппокампе на 2-й, стабильной стадии развития Эпи системы и не оказывает эффекта на очаги ЭпА в корковых структурах и гипоталамусе, как на 1й, так и на 2й стадиях развития Эпи системы. Леветирацетам в дозе 200 мг/кг (в/б) снижает выраженность ЭпА на 2й стабильной стадии развития Эпи системы в корковых структурах и особенно в гиппокампе. Леветирацетам в дозе 500 мг/кг (в/б) усиливает пароксизмальную

активность на 2й стадии развития Эпи системы в ипсилатеральной коре и гипоталамусе. Усиление ЭпА под влиянием леветирацетама в дозе 500 мг/кг было отмечено и в некоторых клинических исследованиях [81, 343]. Леветирацетам не оказывает значимого влияния на начальной, 1й стадии развития Эпи системы. Это согласуется с данными об избирательном воздействии леветирацетама на $ГАМК_А$-рецепторы в условиях развитой эпилептической системы, так как препарат устраняет ингибирующий эффект Zn^{2+} в «эпилептизированной» ткани мозга и не влияет на $ГАМК_А$-рецепторы в условиях нормы. Это аномальное ингибирование цинком (Zn2+) происходит при эпилептизации ткани, например в гиппокампе при прорастании мшистых волокон, при этом $ГАМК_А$-рецепторы мшистых волокон становятся более чувствительны к аллостерическому ингибированию Zn2+.

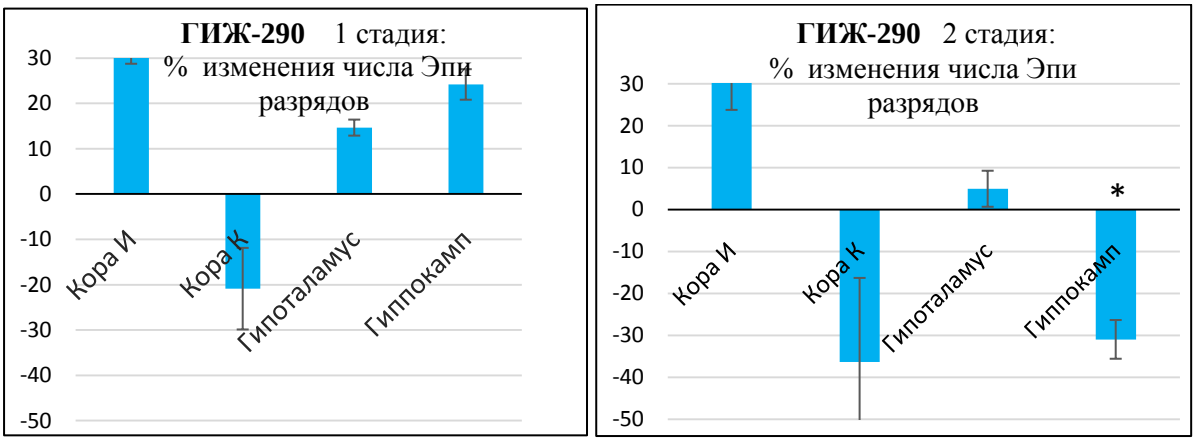
Выявление ЭЭГ мишеней (структуры мозга) действия соединения ГИЖ- 290 и леветирацетама.

Структуры-мишени для соединения ГИЖ-290 и леветирацетама определяли с помощью программы «Brainsys» на двух стадиях развития Эпи системы у крыс с кобальт-индуцированным Эпи очагом, моделирование которого проводили согласно методическим рекомендациям (раздел «Материалы и методы»). Доминантную структуру воздействия соединений определяли по наибольшему подавлению ЭпА (число и длительность разрядов) в структурах мозга.

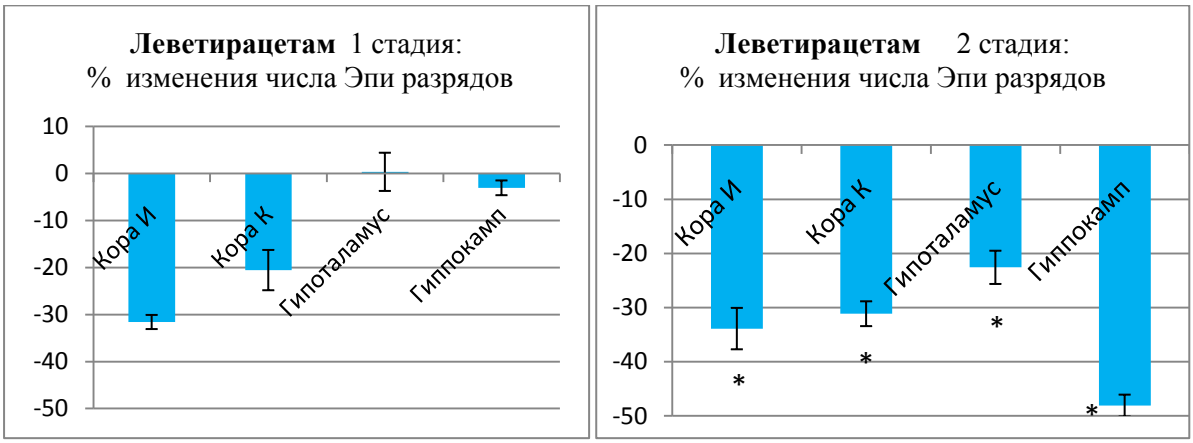
Соединение ГИЖ-290 уменьшало число Эпи-разрядов и их длительность в гиппокампе у крыс только с развитой эпилептической системой, на 2 стабильной стадии, как и препарат сравнения леветирацетам (рисунок 19 А).

Леветирацетам (200 мг/кг) снижал выраженность ЭпА на 2й стабильной стадии развития Эпи системы в корковых структурах и особенно в гиппокампе (рисунок 19 Б).

А



Б



Примечание - Кора И – ипсилатеральная кора, Кора К - контрлатеральная кора; *$P \leq 0,05$ по сравнению с фоном (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 19 – Степень изменения (%) числа разрядов в различных структурах мозга у крыс с кобальт-индуцированным очагом под действием ГИЖ-290 и леветирацетама на 1 и 2 стадиях формирования Эпи системы

Таким образом, установлено, что структурными мишенями противосудорожного действия ГИЖ-290 и леветирацетама, выявленного на 2 стабильной стадии развития Эпи системы, являются гиппокамп.

5.2 Изучение противосудорожного действия соединения ГИЖ-290 и леветирацетама на модели генерализованной эпилептической активности, вызванной бемегридом

Влияние ГИЖ-290 на эпилептическую активность мозга крыс изучали на 4 день после операции по вживлению электродов, в такие структуры как: сенсомоторная, двигательная зона коры (кора), дорзальный отдел гиппокампа, поле СА3 (ГПК) и латеральное поле гипоталамуса (ГПТ). Фоновую запись до введения бемегрида осуществляли в течение 15 минут, затем внутримышечно вводили бемегрид в дозе 10 мг/кг. Регистрировали эпилептиформную активность, вызванную бемегридом, на протяжении 3 часов (контрольная группа). В опытных группах ГИЖ-290 и препарат сравнения леветирацетам вводили через 15 минут после введения бемегрида. Запись ЭЭГ после введения исследуемых веществ продолжалась в течение 1-1,5 часов. В электрограммах каждой из структур анализировали от 3 до 5 минутных интервалов; вычислялись показатели биоэлектрической активности головного мозга - число пароксизмальных разрядов за 1 минуту и среднюю длительность одного разряда.

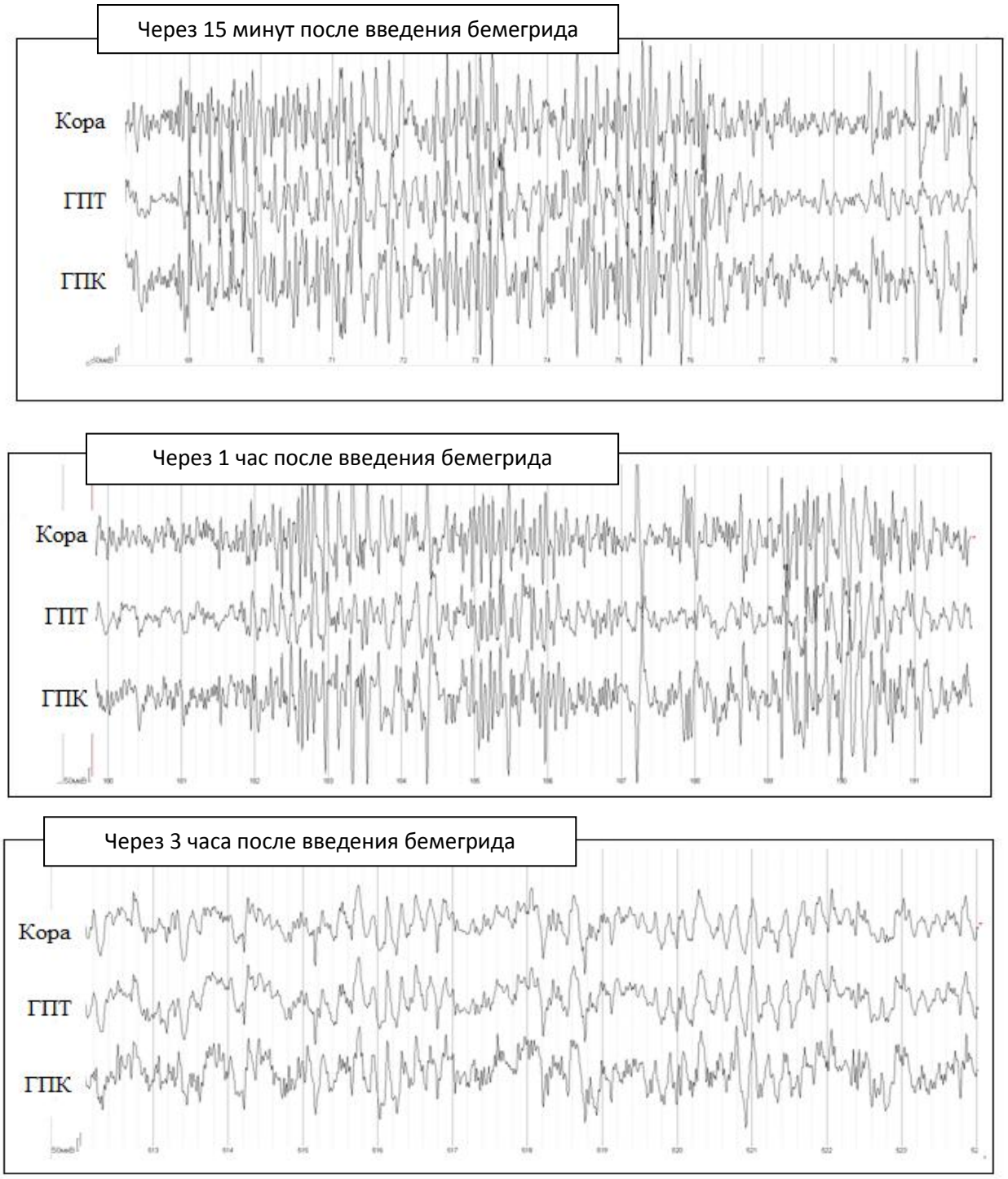
Анализ биоэлектрической активности мозга крыс показал, что после введения бемегрида в дозе 10 мг/кг у крыс во всех исследуемых структурах (сенсомоторная, двигательная зона коры, дорзальный отдел гиппокампа и латеральное поле гипоталамуса) отмечалось наличие

генерализованных эпилептических разрядов. ЭпА появлялась через 1-2 минуты после введения бемегрида и характеризовалась синхронно возникающими пароксизмальными разрядами высокоамплитудных острых и медленных волн. По времени возникновения разрядов не наблюдалось различий между структурами, что свидетельствовало о синхронности возникновения эпилептических разрядов (рисунок 20, таблица 20). ЭпА, вызванная бемегридом, регистрировалась на протяжении 3 часов записи ЭЭГ. Через 15 минут после введения бемегрида отмечалось наличие генерализованных разрядов во всех исследуемых структурах, с преобладанием их по количеству в гиппокампе до 45 разрядов за минуту. Однако наиболее продолжительные разряды отмечались в коре — до 9,6 секунд. Через 1 час после введения бемегрида сохранялась высокая эпилептическая активность в мозге, однако, имеющая тенденцию к снижению в таких структурах как гипоталамус и гиппокамп, приблизительно на 10 разрядов/мин в каждой. В коре количество разрядов не уменьшалось, но их длительность снижалась с 9,6 до 6,5 секунд по сравнению с показателями через 15 мин после введения бемегрида. Через 3 часа после введения бемегрида наблюдалось затухание разрядной эпилептической активности (ЭпА), что регистрировалось по уменьшению количества разрядов в коре, гиппокампе и особенно гипоталамусе. При этом продолжительность разрядов уменьшалось только в гипоталамусе, но их амплитуда снижалась во всех трех структурах (таблица 20, рисунок 20).

Таблица 20 - Влияние бемегрида (10 мг/кг/ в/б) на развитие разрядной эпилептической активности мозга крыс

Структура мозга	Число разрядов за минуту	Продолжительность разрядов ЭпА, в сек
Бемегрид через 15 минут		
Кора	38.42 ± 1.32	9.61 ± 0.59
ГПТ	38.54 ± 2.77	4.78 ± 0.27
ГПК	45.35 ± 2.73	6.50 ± 0.32
Бемегрид через 1 час		
Кора	34.39 ± 1.94	6.53 ± 0.71*
ГПТ	27.45 ± 2.73*	4.72 ± 0.82
ГПК	35.46 ± 3.00	5.03 ± 0.34
Бемегрид через 3 часа		
Кора	27.78 ± 1.96*	7.9 ± 0.68
ГПТ	16.8 ± 1.13*	2.7 ± 0.25*
ГПК	29.56 ± 1.11*	4.88 ± 0.56

Примечания: кора – сенсомоторная область коры, ГПТ – гипоталамус, ГПК-гиппокамп; * - достоверность отличий от показателей, регистрируемых через 15 минут после введения бемегрида, при $P \leq 0,05$ (парный критерий Стьюдента).



Примечание: кора – сенсомоторная область коры, ГПТ – гипоталамус, ГПК-гиппокамп.

Рисунок 20 - Эпилептическая активность мозга крыс, вызванная бемегридом (10 мг/кг/в/б).

Изучение влияния соединения ГИЖ-290 и леветирацетама на ЭпА, вызванную бемегридом, проводили в течение 2 часов. Вводили ГИЖ-290 и леветирацетам на пике бемегрид - индуцированной ЭпА, т.е. через 15 минут после введения бемегрида.

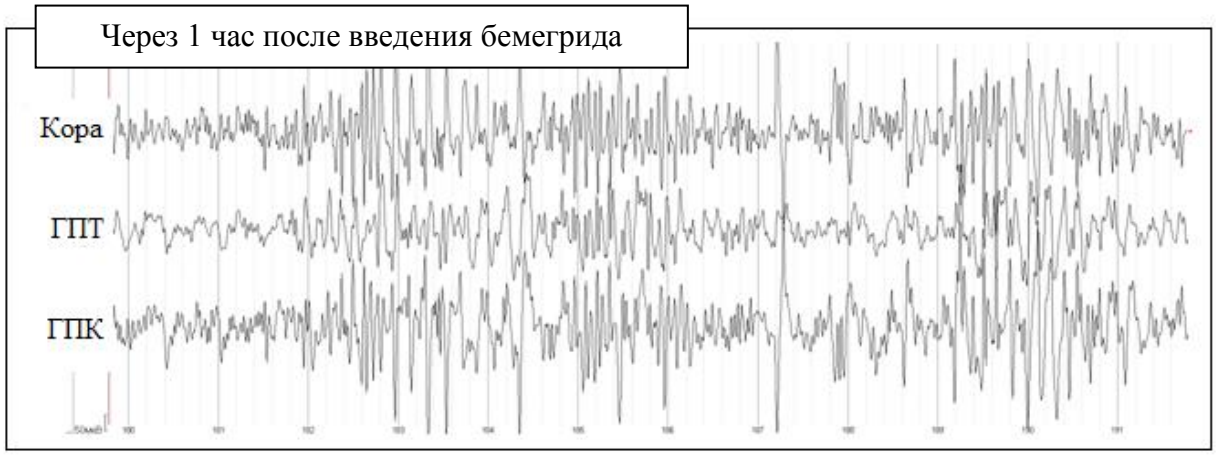
Установлено, что через 1 час после введения ГИЖ-290 в дозе 2,5 мг/кг на фоне развернутой пароксизмальной активности, вызванной бемегридом, не наблюдалось снижения

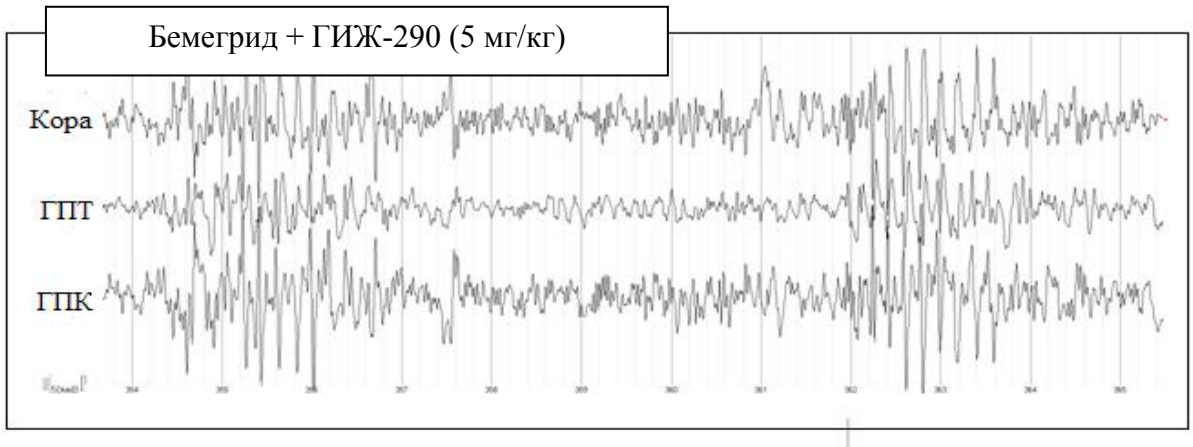
числа разрядов и их длительности ни в одной из исследуемых структур мозга. ГИЖ-290 в дозе 5 мг/кг статистически достоверно уменьшал число разрядов в коре и число разрядов (на уровне тенденции) в гиппокампе. При этом длительность разрядов при введении ГИЖ-290 в данной дозе не изменялось ни в одной из исследуемых структур (таблица 21, рисунок 21).

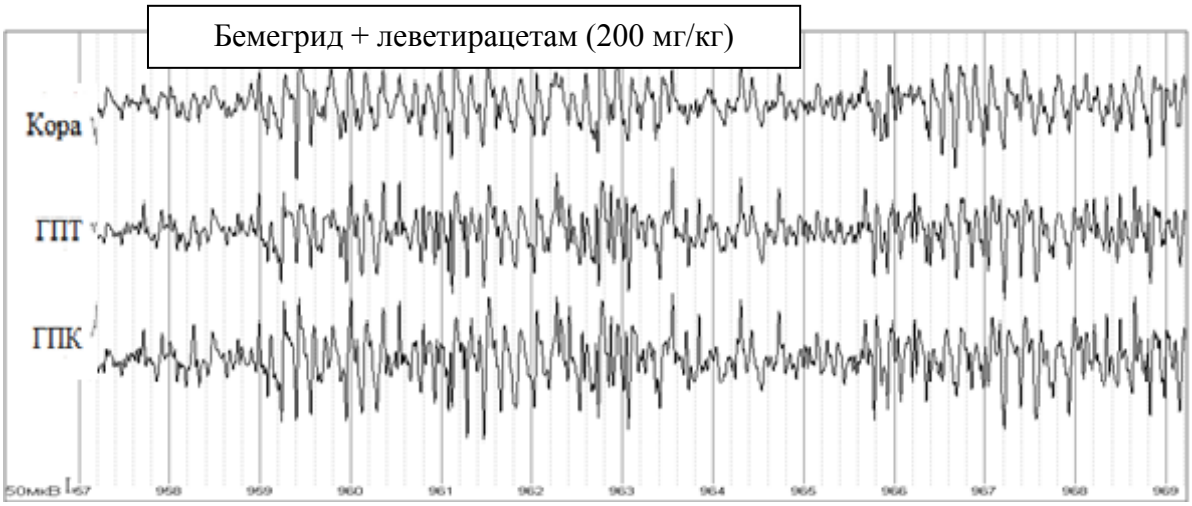
Таблица 21 - Влияние ГИЖ-290 через 1 час после введения на эпилептическую активность мозга крыс, вызванную бемегридом

Группы	Показатели:	Кора	Гипоталамус	Гиппокамп
Контроль Бемегрид	Число разрядов за минуту	34,39 ± 1,94	27,45 ± 2,73	35,46 ± 3,00
	Продолжительность разрядов ЭпА, сек	6,53 ± 0,71	4,72 ± 0,82	5,03 ± 0,34
Бемегрид + ГИЖ-290 (2.5 мг/кг)	Число разрядов за минуту	34,43 ± 1,68	33,15 ± 2,42	28,02 ± 1,46
	Продолжительность разрядов ЭпА, сек	6,38 ± 0,48	4,52 ± 0,87	5,98 ± 0,62
Бемегрид + ГИЖ-290 (5 мг/кг)	Число разрядов за минуту	25,54 ± 1,27*	20,85 ± 2,45	23,13 ± 2,05 P=0.08
	Продолжительность разрядов ЭпА, сек	7,39 ± 1,12	3,39 ± 0,71	6,25 ± 0,89

Примечания: * - достоверность отличий от группы «Контроль Бемегрид», при P≤0,05 (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).







Примечание: кора – сенсомоторная область коры, ГПТ – гипоталамус, ГПК-гиппокамп.

Рисунок 21 - Влияние ГИЖ-290 (5 мг/кг) на эпилептическую активность мозга крыс, вызванную бемегридом

Через 1 час после введения препарата сравнения леветирацетама в дозе 200 мг/кг не наблюдалось достоверного снижения пароксизмальной активности ни в одной из исследуемых структурах мозга относительно контрольных значений с бемегридом. Тенденция к увеличению числа разрядов на фоне леветирацетама наблюдалась в гипоталамусе и гиппокампе (таблица 22).

Таблица 22 - Влияние леветирацетама через 1 час после введения на эпилептическую активность мозга крыс, вызванную бемегридом

Группы	Показатели:	Кора	Гипоталамус	Гиппокамп
Контроль Бемегрид	Число разрядов за минуту	34,39 ± 1,94	27,45 ± 2,73	35,46 ± 3,00
	Продолжительность разрядов ЭпА, сек	6,53 ± 0,71	4,72 ± 0,82	5,03 ± 0,34
Бемегрид + Леветирацетам (200 мг/кг)	Число разрядов за минуту	35,42 ± 2,25	30,12 ± 2,69	38,37 ± 3,23
	Продолжительность разрядов ЭпА, сек	7,85 ± 1,91	5,73 ± 0,62	6,35 ± 0,91

Примечания: * - достоверность отличий от группы «Контроль Бемегрид», при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Таким образом, установлено, что на ЭЭГ модели первично-генерализованной судорожной активности, вызванной бемегридом, соединение ГИЖ-290 в дозе 5 мг/кг вызывает достоверное уменьшение числа Эпи разрядов в коре (контроль - -34,4; на фоне ГИЖ-290 - 25,5), и на уровне тенденции в гиппокампе, что сопровождается уменьшением амплитуды Эпи

разрядов. Препарат сравнения леветирацетам в дозе 200 мг/кг достоверно не изменяет регистрируемые показатели пароксизмальной активности, вызванные бемегридом.

5.3 Изучение противосудорожных эффектов соединения ГИЖ-290 в сравнении с леветирацетамом и фенотропилом на модели пилокарпиновых судорог

Все вещества вводили однократно в/б за 40 минут до введения пилокарпина (350 мг/кг). В течение 90 минут регистрировали латентный период 1 (ЛП1) первого судорожного припадка – генерализованный припадок (клонические судороги), латентный период 2 (ЛП2) – генерализованные клонико-тонические судороги, продолжительные по времени (эпилептический статус), как правило, заканчивающиеся гибелью животного, процент выживших животных в течение 90 минут и через 24 часа.

В опытах установлено, что ГИЖ-290 (5 мг/кг), 40 минут до введения пилокарпина, обладал выраженным противосудорожным эффектом, достоверно увеличивая ЛП первого генерализованного приступа (ЛП1) и латентный период наступления эпилептического статуса (ЛП2). Отмечалось увеличение процента выживших животных через 90 минут и через 24 часа до 100 %. По выраженности эффекта, ГИЖ 290 не уступал препарату сравнения леветирацетаму (600 мг/кг), который увеличивал ЛП1, ЛП2 и процент выживших животных в сопоставимых с ГИЖ-290 величинах относительно показателей значений контрольной группы (таблица 23).

Фенотропил не был эффективен в тесте пилокарпиновых судорог (таблица 23).

Таблица 23 – Противосудорожное действие соединения ГИЖ-290 в тесте пилокарпиновых судорог у крыс, Mean ± SEM

Вещество	ЛП1	ЛП2	Выживших через 90 мин., %	Выживших через 24 часа, %
Контроль (физ. Р-р) + пилокарпин 350 мг/кг,	386,0±84,8	1107,0±93,5	33	33
ГИЖ-290 5 мг/кг + пилокарпин 350 мг/кг.	751,4±149,6*	1856,7±190,6*	100#	100#
Леветирацетам 600 мг/кг + пилокарпин 350 мг/кг	1006,3±83,7*	2087,5±118,4*	100#	100#
Контроль (физ. Р-р) + пилокарпин 350 мг/кг	942±110,0	1098±121,2	71	29
Фенотропил 200 мг/кг + пилокарпин 350 мг/кг, через 50 мин	652,5±64,6	667,8±88,5	0	0

Примечание - *-достоверность отличий от группы контроля, при $P \leq 0,05$ (тест Краскела – Уоллиса с переходом на множественные сравнения (тест Данна)); # - $P \leq 0,05$ (точный критерий Фишера).

Исследование ГИЖ-290 в тесте антагонизма с пилокарпином с предварительным введением раствора хлорида лития

Введение лития хлорида крысам осуществляли за 18 часов до введения пилокарпина. Предварительное введение солей лития повышает нейрональную возбудимость, снижая судорожной порог мозга, что позволяет снизить дозы пилокарпина (с 350 мг/кг до 40 мг/кг). Данная модель судорог является более «жесткой» относительно пилокарпиновых судорог и относится к моделям рефрактерных форм эплепсии.

В контрольной группе крыс после введения пилокарпина в дозе 40 мг/кг латентный ЛП1 первого приступа миоклоний головы составил 482±48 с, а ЛП развития эпилептического статуса составил 1234±129 с. Через 90 минут выживало около 30%, а через сутки - 15% (таблица 24).

Соединение ГИЖ-290 в дозах 2,5 – 10 мг/кг задерживало развитие первых судорожных реакций (ЛП1) и на 87-100% защищало от гибели крыс через 90 минут и 24 часа после введения пилокарпина (таблица 24).

Леветирацетам (600 мг/кг) значительно задерживал развитие первых и генерализованных судорожных проявлений Эпи статуса, защищая животных от последующей гибели (выжило 87,5%) (таблица 24).

Таблица 24 - Противосудорожное действие ГИЖ-290 и леветирацетама в тесте литий-пилокарпиновых судорог у крыс

Вещество	Доза мг/кг	ЛП1 миоклонии головы, с	ЛП2 генерализован-ного приступа с	% выживших крыс через 90мин	% выживших крыс через 24 часа
Контроль (Li+пилокарпина г/хл)	40	481,5±47,6	1233,8± 128,8	30,8	15,4
ГИЖ-290	2,5	980,0±2,7 &	1205,0 ± 2,7	100 #	100 #
	5	902,5±192,3&	1735,7±165,2&	100 #	100 #
	10	917,0±115,7&	1603.3 ± 144.8&	100 #	85,7 #
Леветирацетам	600	1687,5±267,7&	2936,0 ±288,3&	100#	87,6#

Примечания: # - достоверность отличий от группы контроля, при $P \leq 0,05$ (точный критерий Фишера); & - достоверность отличий от группы контроля, при $P \leq 0,05$ и && при $p \leq 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).

Таким образом, соединение ГИЖ-290 способно предупреждать развитие эпилептического статуса, развивающегося при введении пилокарпина или литий пилокарпина

крысам, и защищать от гибели в течение 90 минут с сохранением эффекта в течение 24 часов. По выраженности противосудорожного эффекта ГИЖ-290 и леветирацетам имеют сходный профиль, однако леветирацетам уступает соединению ГИЖ-290 по активности.

Исследование ГИЖ-290 и леветирацетама в тесте судорог, вызванных пилокарпином, у мышей

В эксперименте использовали беспородных мышей самцов, массой 23-25 г. Соединения вводили животным однократно в/б за 40 минут до пилокарпина (380 мг/кг).

В опытах установлено, что ГИЖ-290 в дозах 2,5 и 5 мг/кг за 40 минут до введения пилокарпина в дозе 380 мг/кг обладал выраженным противосудорожным эффектом, сопоставимым с леветирацетамом в дозе 600 мг/кг, достоверно увеличивая латентный период (ЛП) гибели животных относительно контрольных значений без терапии (таблица 25).

Таблица 25 – Влияние ГИЖ-290 и леветирацетама на развитие судорожных реакций, вызванных пилокарпином у мышей

Группа животных	Доза, мг/кг	ЛП гибели, Mean ± SEM	Число выживших/число мышей в группе	Выживших, %
Контроль (пилокарпина г/хл)	380	9,30 ± 0,57	0/10	0
ГИЖ-290	2,5	23,75 ± 5,91*	1/7	14
	5	15,20 ± 1,96*	0/10	0
Леветирацетам	600	16,00 ± 1,92**	0/10	0

Примечание - *-достоверность отличий от группы контроля, при *P≤0,05 и **P≤0,01 (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).

Таким образом, ГИЖ-290 при однократном в/б введении в дозах 2,5 и 5 мг/кг воспроизводит противосудорожный эффект, выявленный ранее в тесте пилокарпиновых судорог на крысах.

5.4 Изучение спектра нейропсихотропной активности ГИЖ-290 в сравнении с леветирацетамом

Целью данного раздела исследования было выявить спектр нейропсихотропных эффектов, соединения ГИЖ-290 (производного 4-фенилпирролидона), являющегося структурным аналогом леветирацетама. ГИЖ-290 в сравнении с леветирацетамом изучали в поведенческих тестах, включающих оценку когнитивных функций (тест лабиринт Морриса, тест Y-лабиринт), эмоционального состояния (тест ПКЛ) и противосудорожной активности в тесте пилокарпиновых судорог. В исследовании были использованы аутбредные мыши самцы массой 24-26 г.

Влияние ГИЖ-290 и леветирацетама на тревожное состояние животных в условиях теста приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ)

В тесте ПКЛ контрольные животные, получившие физиологический раствор, предпочитали большую часть времени проводить в закрытых, темных рукавах лабиринта. Эмоциональный статус животных после введения соединений оценивали по изменению числа заходов в светлые рукава лабиринта и времени нахождения в них, без увеличения общего числа заходов. По общему числу заходов в открытые и закрытые рукава оценивалась общая двигательная активность (таблица 26).

Установлено, что ГИЖ-290 в дозе 10 мг/кг при однократном введении не увеличивал время, проведенное в открытых рукавах лабиринта, и число их посещений. При однократном введении леветирацетама (200 мг/кг) не наблюдалось изменений количества переходов и времени, проведенного в открытых рукавах установки. Общая двигательная активность относительно группы контроля не менялась (таблица 26).

Таблица 26 – Изучение влияния ГИЖ-290 на эмоциональное поведение мышей в тесте ПКЛ, Mean ± SEM

	ЛП	Центр. площадки, с	Кол-во переходов в закрытые рукава	Время провед-ое в закрытых рукавах, с	Кол-во переходов в открытые рукава	Время проведенное в открытых рукавах, с	Общее кол-во переходов
Контроль, физ. р-р	1,3 ±0,6	30,7 ±6,2	13,0 ± 1,5	192,1 ± 24,8	6,2 ± 1,7	77,2 ± 23,8	19,2 ±1,2
ГИЖ-290, 10 мг/кг	1,2 ±0,7	19,3 ±5,7	15,6 ± 2	178,9 ± 24,1	10,0 ± 2	101,8 ± 20,6	25,6 ±3,2
Леветирацетам 200 мг/кг	0,7 ±0,3	35,2 ±7,1	18,4 ± 1,9	151,4 ± 12,6	10,4 ± 1,8	113,4 ± 15,9	28,8 ±3,1

Таким образом, ГИЖ-290 (10 мг/кг) и препарат сравнения леветирацетам (200 мг/кг) в условиях методики ПКЛ не оказывали влияние на эмоциональное состояние животных, что регистрировалось по отсутствию значимых изменений числа заходов в открытые рукава установки и времени, проведенного в них.

Влияние соединения ГИЖ-290 и леветирацетама на когнитивные функции в условиях теста Y-образного лабиринта

Пространственную рабочую память оценивали по количеству правильных последовательных чередований трех рукавов лабиринта. Животное с хорошей памятью будет помнить рукава лабиринта, которые оно посещало ранее и переходить в менее посещаемый рукав. Нарушение рабочей памяти будет приводить к пребыванию в ранее посещенном рукаве и соответственно низкому проценту правильных чередований.

Поведение животных, получивших однократно ГИЖ-290 (10 мг/кг) не отличалась от поведения контрольных мышей. Процент правильного чередования рукавов контрольных животных, критерий отражающий функцию кратковременной памяти, составил 80,6 % в среднем за 25,4 посещений. ГИЖ-290 не нарушал исследовательское поведение животных и правильность чередования рукавов лабиринта (таблица 27).

Исследование поведения мышей в Y-образном лабиринте, получивших леветирацетам (200 мг/кг), выявило тенденцию к снижению результативных чередований по сравнению с контрольными животными и составило в среднем 59,9 % (таблица 27).

Таблица 27 – Влияние соединения ГИЖ-290 и леветирацетама на когнитивные функции у мышей в тесте Y-лабиринта при однократном введении, Mean ± SEM

Группа животных	Доза, мг/кг /однократно	Правильных чередований, %	Количество входов в рукава
Контроль	-	79,6 ± 10,4	23,2 ± 2,1
ГИЖ-290	10	80,6 ± 10,6	25,4 ±1,8
Леветирацетам	200	59,9 ± 8,3*	18,3 ± 7,2*

Примечание - *-достоверность отличий от группы контроля, при $P \leq 0,05$ и (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).

Полученные результаты свидетельствуют, что соединение ГИЖ-290 (10 мг/кг, однократно) не нарушает кратковременную рабочую память у мышей в тесте Y-образного лабиринта. Однако для леветирацетама было выявлено умеренное снижение количества правильных чередований, что возможно, вызвано седативным эффектом, регистрируемым по снижению общей двигательной активности в лабиринте. Выявленный седативный эффект леветирацетама согласуется с наблюдениями, полученными у пациентов при первых приемах препарата в течение первой недели.

Влияние соединения ГИЖ-290 и леветирацетама на выработку и воспроизведение пространственного навыка в тесте водного лабиринта Морриса

Установлено, что мыши контрольной группы в 1й день обучения тратили на поиски скрытой под водой платформы в среднем 35 секунд. При воспроизведении пространственного навыка через 48 часов после последнего сеанса обучения (3 дня обучения по 2 сеанса) время пребывания контрольных мышей в «целевом» секторе, где ранее (при обучении) находилась платформа, составило 9,71 с (таблица 28).

Соединение ГИЖ-290 в дозах 2,5 и 5 мг/кг достоверно уменьшало среднее время нахождения платформы в первый день обучения. При воспроизведении навыка ГИЖ-290 в дозе 2,5 и 5 мг/кг (на 5й день введения) способствовал увеличению времени нахождения в «целевом» секторе (таблица 28).

Леветирацетам в дозе 600 мг/кг не оказывал позитивного влияния на обучение животных пространственному навыку в 1й день обучения в лабиринте. Однако препарат (5 дней введения) улучшал показатели воспроизведения – увеличивал время пребывания животных в «целевом» секторе (таблица 28).

Пирацетам (400 мг/кг/5дней введения) сокращал время нахождения платформы в 1й день обучения и увеличивал время пребывания животных в «целевом» секторе, (таблица 28)

Таблица 28 - Влияние соединения ГИЖ-290, леветирацетама и пирацетама на обучение поиска скрытой платформы и воспроизведение навыка в водном лабиринте Морриса

Группы животных	1й день обучения:	Воспроизведение ч/з 5 дней после начала обучения:
	время нахождения мышами платформы, с	время пребывания мышей в секторе, где находилась платформа, с
Контроль (физиологический раствор), N=8	35,2±7,07	9,71±1,43
ГИЖ-290 2,5мг/кг N=8	19,5 ± 5,57*	15,88 ± 1,36*
ГИЖ-290 5 мг/кг N=8	17,8 ± 5,22*	17,25 ± 2,07*
Леветирацетам 600 мг/кг N=8	33,6±7,77	14,14±1,74*
Пирацетам 400мг/кг N=8	21,9 ±5,04*	17,14±0,9*

Примечание: * - достоверность отличий от группы контроля, при P≤0,05 (тест Краскела-Уоллиса с переходом на множественные сравнения).

Таким образом, установлено, что ГИЖ-290 (2,5 и 5 мг/кг/5дней), как и пирацетам (400 мг/кг/5дней), обладает способностью улучшать поведенческие показатели кратковременной рабочей памяти и способствует воспроизведению памятного следа в тесте водного лабиринта Морриса. Структурный аналог соединения ГИЖ-290, леветирацетам (600 мг/кг/5дней), не оказывает влияния на обучение, но способствует воспроизведению памятного следа. Отсутствие эффекта леветирацетама на время поиска платформы при обучении, возможно, вызвано наличием у него седативного действия.

Полученные данные свидетельствуют о том, что соединение ГИЖ-290 обладает отчетливой ноотропной активностью, что выражается в способности соединения улучшать как процесс обучения, так и процесс воспроизведения пространственного навыка в водном лабиринте Морриса. По выраженности ноотропного эффекта ГИЖ-290 не уступает пирацетаму и многократно превосходит его по активности. Соединение ГИЖ-290 по активности и эффективности значительно превосходит леветирацетам.

Заключение

Таким образом, соединение ГИЖ-290 (5 мг/кг) в ЭЭГ исследованиях на модели хронической очаговой эпилепсии, индуцированной кобальтом, уменьшает очаги ЭпА в гиппокампе на 2-й стабильной стадии развития Эпи системы. Леветирацетам в дозе 200 мг/кг значительно подавляет пароксизмальную активность также на 2й стадии развития Эпи системы во всех структурах мозга, с наибольшим влиянием в гиппокампе. Однако в дозе 500 мг/кг леветирацетам усиливает ЭпА в гипоталамусе и ипсилатеральтной коре. В ЭЭГ исследованиях в модели судорог, вызванных бемегридом, ГИЖ-290, в отличие от леветирацетама, уменьшает ЭпА в сенсоматорной коре и в гиппокампе, а леветирацетам не оказывает влияние на ЭпА.

Соединение ГИЖ-290 и леветирацетам с сопоставимой эффективностью устраняют проявления эпилептического статуса в модели пилокарпиновых и литий-пилокарпиновых судорог.

ГИЖ-290 обладает ноотропной активностью, сопоставимой с пирацетамом, и превосходит эффекты леветирацетама.

Все противосудорожные и психотропные эффекты соединения ГИЖ-290 проявляются в многократно меньших дозах, чем у препаратов сравнения – леветирацетама и пирацетама.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:

*Ковалев И.Г. Сравнение противосудорожных и мнемотропных свойств новых производных 4-фенилпирролидона, леветирацетама и пирацетама. [Текст] / И.Г. Ковалев, Т.А. Воронина, **С.А. Литвинова**, Л.А. Жмуренко, Г.В. Мокров // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. - Том 80, № 6. – С.13-18 [43].*

*Литвинова С.А. Особенности действия леветинола на развитие судорожной активности у крыс с кобальт-индуцированной хронической эпилепсией [Текст] / **Литвинова С.А.,** Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Кутепова И.С., Авакян Г.Г., Авакян Г.Н. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. - 2018. - Т. 10, № 1. - С. 52 – 62 [59].*

*Литвинова С.А. Сравнение эффектов и электрофизиологических механизмов действия вальпроевой кислоты и леветирацетама на экспериментальной модели очаговой эпилепсии [Текст] / **Литвинова С.А.,** Авакян Г.Г., Воронина Т.А., Гайдуков И.О., Неробкова Л.Н., Кутепова И.С., Авакян Г.Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии.- 2018. - Том 12, № 3. - С.45-52 [58].*

*Жмуренко Л.А. Синтез, противосудорожная и ноотропная активность производных 4-фенилпирролидона [Текст] / Жмуренко Л.А., **Литвинова С.А.,** Мокров Г.В., Ковалев И.Г., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Гудашева Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 5. – С. 20-27 [32].*

*Воронина, Т. А. Изучение действия соединения ГИЖ-290 и леветирацетама на эпилептическую активность в структурах мозга крыс на ЭЭГ модели судорог, вызванных бемегридом [Текст] / Воронина Т.А., **С. А. Литвинова,** Ковалев И. Г. // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2020. - №4. - С.14-19 [12].*

*Воронина Т. А. Изучение электрофизиологических механизмов противосудорожного действия оригинального аналога леветирацетама – соединения ГИЖ-290. [Текст] / Воронина Т. А., **Литвинова С.А.,** Гладышева Н. А., Яковлева А. А..// Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2021. № 1. –С. 38–44 [13].*

Глава 6 Расширенное изучение противосудорожных и нейропсихотропных эффектов соединений-лидеров из ряда оксимов дибензофуранона (ГИЖ-272 и ГИЖ-332)

Изучение особенностей противосудорожных эффектов ГИЖ-272 и ГИЖ-332 проводили в хронической кобальтовой модели эпилепсии и в модели генетически детерминированной аудиогенной эпилепсии (крысы линии Крушинского-Молодкиной) в сравнении с леветирацетамом.

6.1 Влияние соединений ГИЖ-332 и ГИЖ-272 на развитие эпилептической системы в модели кобальт-индуцированной хронической фокальной (парциальной) эпилепсии в сравнение с леветирацетамом

В исследовании использовали беспородных крыс самцов, массой 260-300 г. В модели хронической кобальт-индуцированной эпилепсии ГИЖ-332, ГИЖ-272 и препарат сравнения леветирацетам вводили в/б на 2 и 6 день после фоновой записи ЭЭГ, согласно дизайну исследования, который представлен в разделе «Материалы и методы». Фармакологический эффект соединений регистрировали через 1 и 2 часа после введения. Исследование эффектов ГИЖ-332 (10 мг/кг) и ГИЖ-272 (40 мг/кг) проводили в дозах, выбранных по результатам теста МЭШ.

На 1-й стадии развития Эпи системы (через 48 часов) выявлено образование очагов ЭпА во всех исследуемых структурах с наибольшим числом и продолжительностью разрядов в ипсилатеральной коре и гипоталамусе. Отмечалось значительное опережение в возникновении ЭпА в ипсилатеральной коре, что может свидетельствовать о формировании детерминантной (ведущей) структуры ЭпА на данной стадии развития.

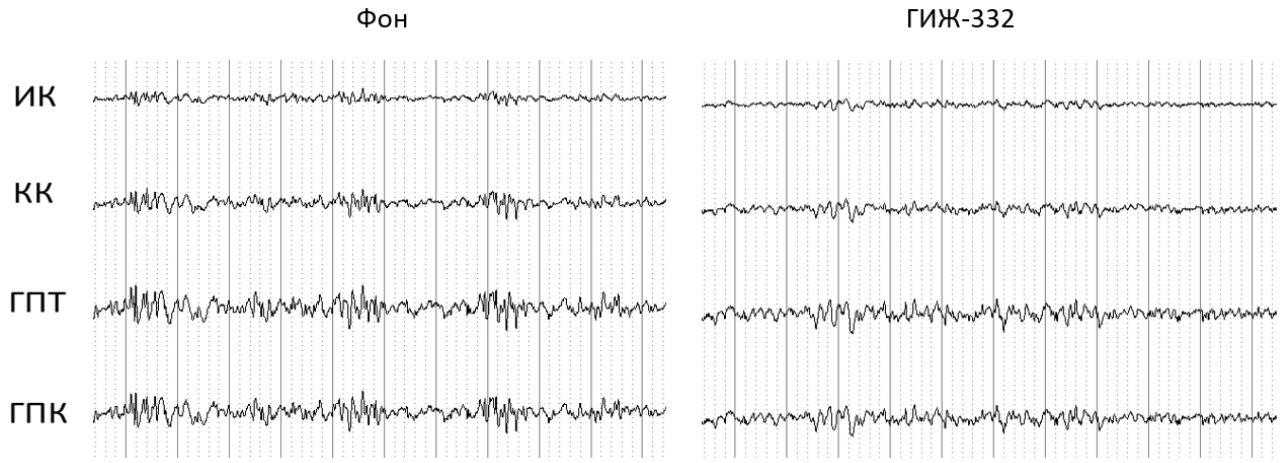
Установлено, что через 1 час после введения соединения ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг (на 1й стадии) наблюдалась тенденция к уменьшение числа разрядов в электрокортикограммах контр- и ипсилатеральной коры на 26-30% и длительности разрядов в этих структурах на 41-47%. Через 2 часа после введения ГИЖ-332 противосудорожные эффекты ослабевали, однако сохранялось снижение по показателю длительность разрядов на 32-38% в обеих корковых структурах (таблица 29, рисунок 22).

На 2-й стабильной стадии формирования Эпи системы ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг значимо уменьшал число и длительность разрядов в корковых структурах. Анализ степени снижения показателей ЭпА в различных структурах мозга через 1 час после введения ГИЖ-332 показал, что количество разрядов в контр- и ипсилатерельной коре статистически достоверно снижалось на 29-31%, а длительность разрядов в этих структурах сокращалась на 33-36%. Через 2 часа после введения ГИЖ-332 тенденция к снижению достоверно сохранялась только в контрлатеральной коре, о чем свидетельствовало уменьшение числа разрядов на 25% и их длительности на 34% (таблица 30, рисунок 23).

Таблица 29 – Влияние соединения ГИЖ-332 на число и длительность судорожных разрядов на 1-й стадии формирования Эпи системы

Структуры мозга	Контроль (фон)		ГИЖ-332 (10 мг/кг) через 1 час		ГИЖ-332 (10 мг/кг) через 2 часа	
	Число разрядов за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с
ИК	21,1±2,9	3,7±0,6	14,8±2,9 $	1,96±0,5$^{\$}$	17,8±4,3	2,3±0,7$^{\$}$
КК	17,7±1,0	2,6±0,3	13,2±2,6 $	1,5±0,3*	14,1±3,4	1,8±0,6
ГПТ	23,9±2,8	3,3±0,5	19,3±3,1	2,2±0,3	22,6±3,8	2,9±0,5
ГПК	23,7±3,5	2,9±0,5	18,3±2,8	1,9±0,3	20,7±4,6	2,2±0,2

Примечания: ИК – ипсилатеральная кора, КК – контрлатеральная кора, ГПТ – гипоталамус, ГПК – гиппокамп;. *P≤0,05; $ P≤0,1 по сравнению с контрольными (фон) значениями (парный критерий Стьюдента).



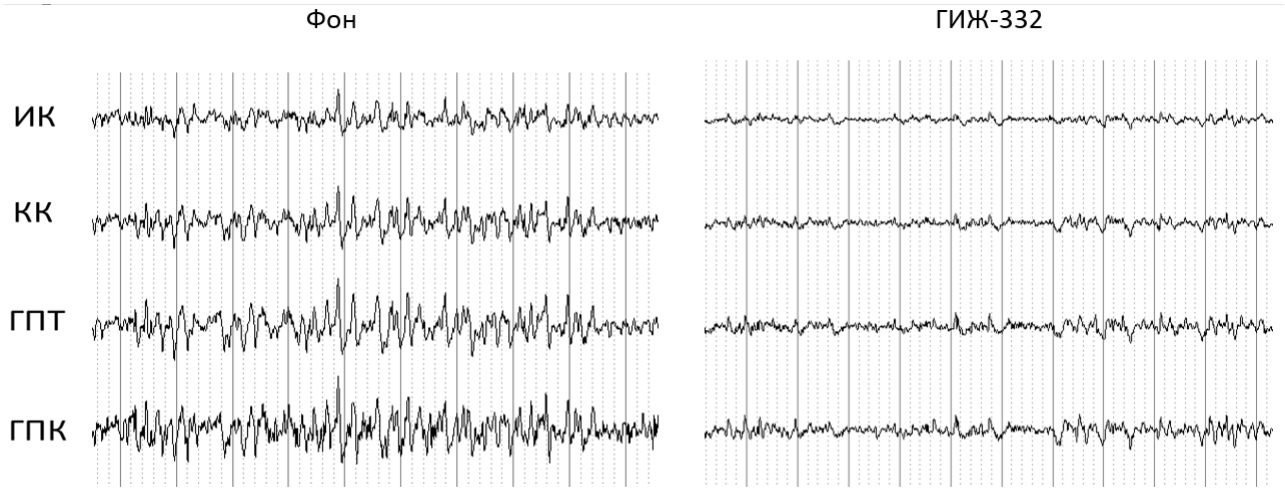
Примечание - ИК-ипсилатеральная кора, КК-контрлатеральная кора, ГПК-гиппокамп, ГПТ-гипоталамус

Рисунок 22 – Электрограммы структур мозга крыс с кобальтовой эпилепсией до и после введения ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг на 1-й стадии формирования Эпи системы

Таблица 30 – Влияние соединения ГИЖ-332 на число и длительность судорожных разрядов на 2-й стадии формирования Эпи системы

Структуры мозга	Контроль (фон)		ГИЖ-332 (10 мг/кг) через 1 час		ГИЖ-332 (10 мг/кг) через 2 часа	
	Число разрядов за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с
ИК	18,0±1,7	2,7±0,4	12,7±1,6*	1,7±0,4 $	15,2±1,3	2,1±0,3
КК	19,5±1,7	1,9±0,3	10,7±1,5*	1,3±0,2 $	11,6±1,6 $	1,3±0,3 $
ГПТ	25,4±2,3	2,9±0,4	20,9±1,8	2,2±0,3	22,2±1,5	2,3±0,2
ГПК	15,3±2,4	1,6±0,3	11,3±1,7	1,0±0,2	13,2±1,8	1,2±0,3

Примечания: сокращения см. таблицу 29; *P≤0,05; $ P≤0,1 по сравнению с контрольными (фон) значениями (парный критерий Стьюдента).



Примечание - ИК-ипсилатеральная кора, КК-контрлатеральная кора, ГПК-гиппокамп, ГПТ-гипоталамус

Рисунок 23 – Электрограммы структур мозга крыс с кобальтовой эпилепсией до и после введения ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг на 2-й стадии формирования Эпи системы

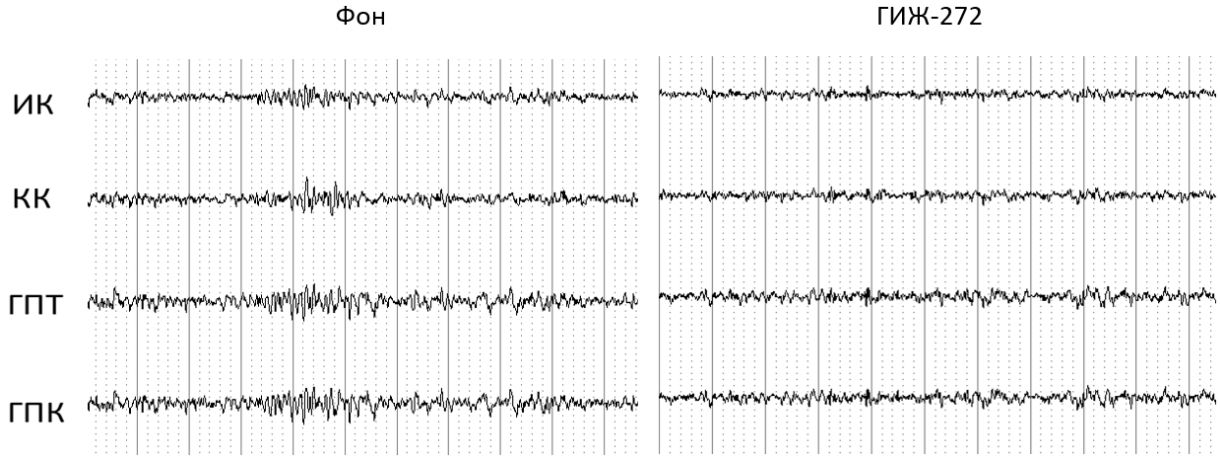
Таким образом, в условиях методики парциальной (фокальной) эпилепсии, моделирующей первично и вторично-генерализованные судороги у крыс с хроническим кобальт-индуцированным эпилептогенным очагом, ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг оказывает наиболее выраженный противосудорожный эффект на 2-й стадии развития Эпи системы в кортикограммах. Максимальный эффект соединения ГИЖ-332 наблюдается через 1 час после введения и регистрируется по снижению числа и длительности Эпи разрядов в ипси- и контрлатеральной коре.

Изучение влияния ГИЖ-272 в дозе 40 мг/кг на ЭпА мозга крыс на 1-й стадии развития Эпи системы через 1 час после введения выявило статистически значимое (на 28%) снижение длительности разрядов в гипоталамусе. Через 2 часа после введения ГИЖ-272 регистрировалось более глубокое снижение количества и длительности разрядов в гипоталамусе на 35% и 39% соответственно, а также уменьшение продолжительности разрядов в гиппокампе (таблица 31, рисунок 24).

Таблица 31 – Влияние соединения ГИЖ-272 на число и длительность судорожных разрядов на 1-й стадии формирования Эпи системы

Структуры мозга	Контроль (фон)		ГИЖ-272 (40 мг/кг) через 1 час		ГИЖ-272 (40 мг/кг) через 2 часа	
	Число разрядов за минуту	Длитель-ность разрядов ЭпА, за минуту, сек	Число разрядов ЭпА за минуту	Длитель-ность разрядов ЭпА, за минуту, сек	Число разрядов ЭпА за минуту	Длитель-ность разрядов ЭпА, за минуту, сек
ИК	9,6 ± 0,7	1,5 ± 0,2	8,9 ± 0,2	1,5 ± 0,0	10,6±1,1	1,8 ± 0,2
КК	10,1±0,8	1,5 ± 0,1	11,3±1,0	1,5 ± 0,1	10,0±1,6	1,2 ± 0,3
ГПТ	10,6±1,2	1,4 ± 0,2	8,9 ± 0,8	1,0 ± 0,1*	6,9±0,8*	0,9 ± 0,1*
ГПК	12,8±1,8	1,7 ± 0,1	12,4±2,0	1,5 ± 0,3	10,4±2,0	1,1 ± 0,2*

Примечание - сокращения см. таблицу 29; * P≤0,05; $ P≤0,1 по сравнению с контрольными (фон) значениями (парный критерий Стьюдента).



Примечание - ИК-ипсилатеральная кора, КК-контрлатеральная кора, ГПК-гиппокамп, ГПТ-гипоталамус

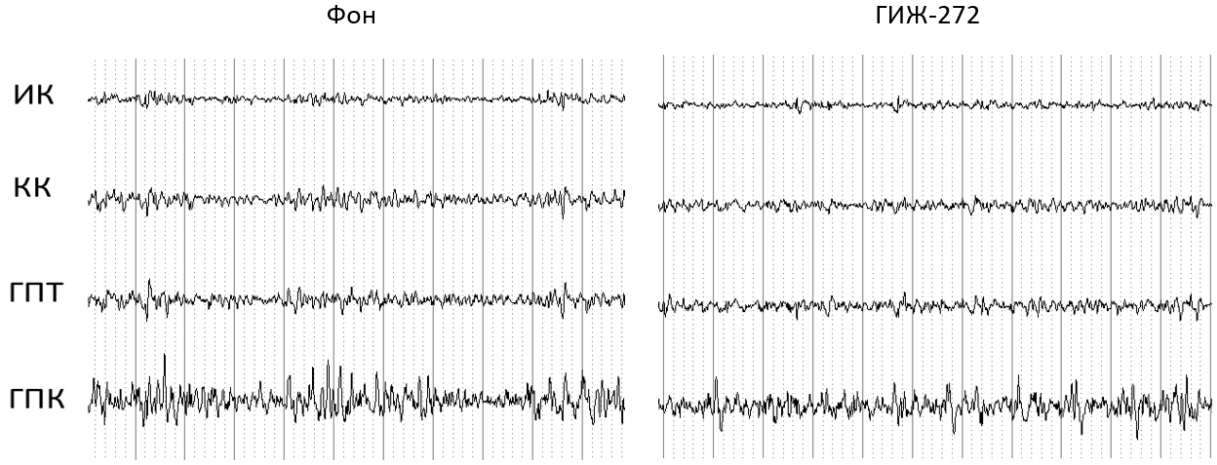
Рисунок 24 – Электрограммы структур мозга крыс с кобальтовой эпилепсией до и после введения ГИЖ-272 в дозе 40 мг/кг на 1-й стадии формирования Эпи системы

На 2-й стадии формирования Эпи системы соединение ГИЖ-272 в дозе 40 мг/кг вызывал уменьшение (на уровне тенденции) числа разрядов в гиппокампе через 1 час после введения, а через 2 часа после введения - достоверное уменьшение количество разрядов в данной структуре и снижение длительности разрядов на уровне тенденции в гипоталамусе (таблица 32, рисунок 25).

Таблица 32 – Влияние соединения ГИЖ-272 на число и длительность судорожных разрядов на 2-й стадии формирования Эпи системы

Структуры мозга	Контроль (фон)		ГИЖ-272 (40 мг/кг) через 1 час		ГИЖ-272 (40 мг/кг) через 2 часа	
	Число разрядов за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, сек	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, сек	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, сек
ИК	19,9 ± 2,5	2,7 ± 0,2	15,1 ± 3,0	2,3 ± 0,4	18,6 ± 0,7	2,6 ± 0,2
КК	15,2 ± 1,8	1,6 ± 0,2	15,4 ± 2,7	1,4 ± 0,2	12,3 ± 2,4	1,3 ± 0,2
ГПТ	15,4 ± 1,0	1,5 ± 0,1	16,4 ± 1,2	1,4 ± 0,1	14,1 ± 0,7	1,3 ± 0,1$^{\$}$
ГПК	20,2 ± 1,4	2,2 ± 0,3	17,2±0,6$^{\$}$	1,8 ± 0,3	15,9±0,8*	1,8 ± 0,2

Примечание - сокращения см. таблицу 29; * $P \leq 0,05$; $ $P \leq 0,1$ по сравнению с контрольными (фон) значениями (парный критерий Стьюдента).



Примечание - ИК-ипсилатеральная кора, КК-контрлатеральная кора, ГПК-гиппокамп, ГПТ-гипоталамус.

Рисунок 25 – Электрограммы структур мозга крыс с кобальтовой эпилепсией до и после введения ГИЖ-272 в дозе 40 мг/кг на 2-й стадии формирования Эпи системы

Таким образом, в условиях методики парциальной (фокальной) эпилепсии, моделирующей первично и вторично-генерализованные судороги в хроническом эксперименте у крыс с хроническим кобальт-индуцированным эпилептогенным очагом, ГИЖ-272 в дозе 40 мг/кг оказывает выраженный противосудорожный эффект на эпилептические очаги в гипоталамусе и гиппокампе на 1й стадии развития Эпи системы, и в гиппокампе на 2-й стадии формирования очагов ЭпА. Эффект соединения ГИЖ-272 развивается в течение 2-го часа после введения и более выражен на 1 стадии развития Эпи системы.

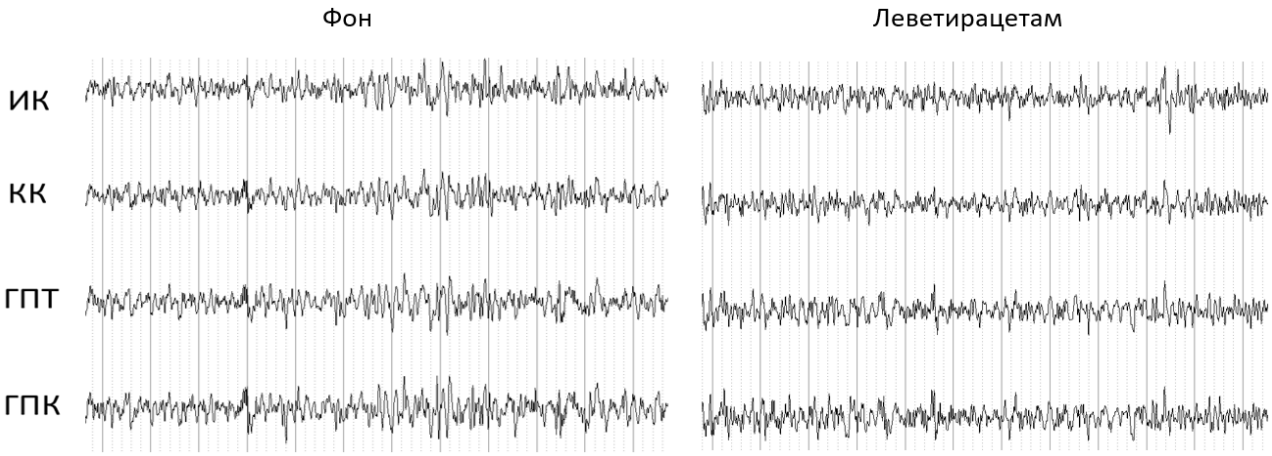
Доза препарата сравнения леветирацетама подбиралась эмпирически при качественной оценке показателей ЭЭГ и составила 200 мг/кг.

Через 1 и 2 часа после введения леветирацетама в дозе 200 мг/кг на 1-й стадии формирования Эпи системы отмечалось тенденция к снижению числа ($p \leq 0,08$) и длительности разрядов ЭпА ($p \leq 0,07$) в ипсилатеральной коре (доминантном первичном очаге) и тенденция к снижению продолжительности разрядов в контралатеральной коре. В остальных исследуемых структурах мозга значимых изменений выраженности ЭпА под влиянием препарата не наблюдалось (таблица 33, рисунок 26).

Таблица 33 – Влияние леветирацетама на число и длительность судорожных разрядов на 1-й стадии формирования Эпи системы

Структуры мозга	Контроль (фон)		Леветирацетам (200 мг/кг) через 1 час		Леветирацетам (200 мг/кг) через 2 часа	
	Число разрядов за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с
ИК	22,0 ± 2,5	2,9 ± 0,3	15,1 ± 0,9 $	2,0 ± 0,2$	14,7 ± 0,8 $	1,9 ± 0,2$
КК	20,7 ± 1,7	2,3 ± 0,1	16,4 ± 2,5	1,7 ± 0,3$	15,9 ± 2,1	1,5 ± 0,3$
ГПТ	15,2 ± 1,1	1,9 ± 0,3	15,3 ± 2,3	1,5 ± 0,2	14,9 ± 2,5	1,2 ± 0,2
ГПК	18,1 ± 1,0	2,1 ± 0,2	17,5 ± 0,9	1,6 ± 0,1	17,3 ± 0,8	1,5 ± 0,1

Примечание - сокращения см. таблицу 29; *$P \leq 0,05$; $ $P \leq 0,1$ по сравнению с контрольными (фон) значениями (парный критерий Стьюдента).



Примечание - ИК-ипсилатеральная кора, КК-контрлатеральная кора, ГПК-гиппокамп, ГПТ-гипоталамус

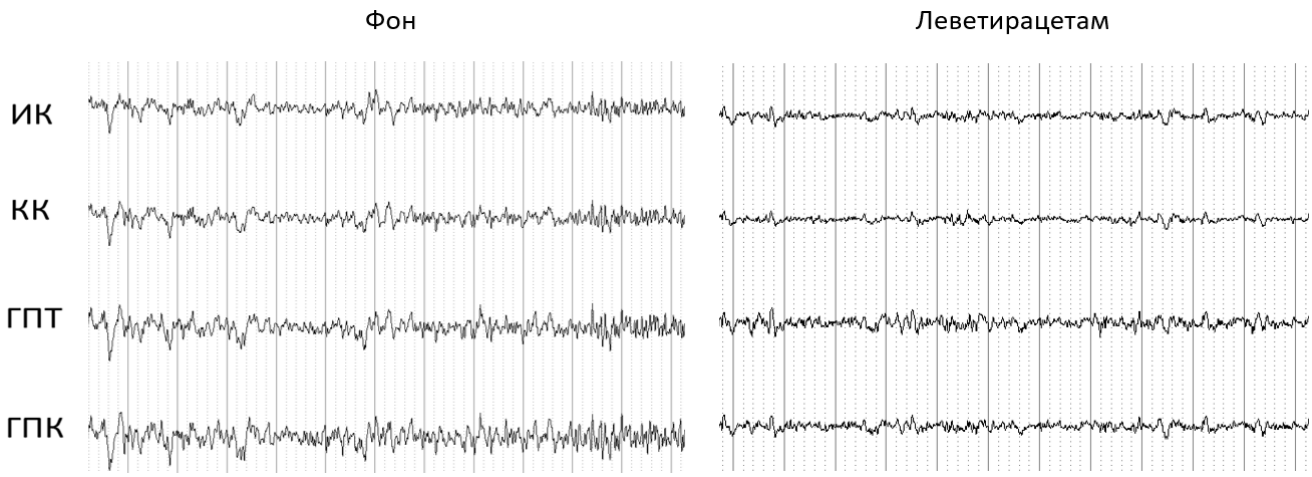
Рисунок 26 – Электрограммы структур мозга крыс с кобальтовой эпилепсией до и после введения леветирацетама в дозе 200 мг/кг на 1-й стадии формирования Эпи системы

На 2-й стадии развития Эпи системы при введении леветирацетама в дозе 200 мг/кг наблюдалось статистически достоверное снижение разрядов ЭпА и их длительности во всех исследуемых структурах мозга (ипсилатеральная кора, контрлатеральная кора, гиппокамп и гипоталамус). Показано, что наиболее выраженный эффект выявлялся во вторичном доминантном очаге ЭпА – гиппокампе, где наблюдалось уменьшение числа разрядов на 48%, а их длительности – на 61% относительно контрольных значений (таблица 34). В остальных структурах подавление генерализованной пароксизмальной активности носило равнозначный характер и характеризовалось снижением числа эпиразрядов на 23-35%, а их продолжительности – на 44-49% (таблица 34, рисунок 27).

Таблица 34 – Влияние леветирацетама на число и длительность судорожных разрядов на 2-й стадии формирования Эпи системы

Структуры мозга	Контроль (фон)		Леветирацетам (200 мг/кг) через 1 час		Леветирацетам (200 мг/кг) через 2 часа	
	Число разрядов за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, сек	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, сек	Число разрядов ЭпА за минуту	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, сек
ИК	22,0 ± 1,5	2,7 ± 0,2	14,5 ± 2,2 *	1,4 ± 0,2 *	14,1 ± 2,0 *	1,3 ± 0,2 *
КК	19,6 ± 1,1	2,2 ± 0,2	13,5 ± 1,3 *	1,3 ± 0,1 *	13,3 ± 1,2 *	1,2 ± 0,1 *
ГПТ	15,8 ± 0,8	1,9 ± 0,1	12,3 ± 1,8 *	1,0 ± 0,2 *	12,0 ± 1,9 *	1,0 ± 0,3 *
ГПК	22,3 ± 1,4	2,4 ± 0,2	11,6 ± 1,4 *	1,0 ± 0,1 *	11,9 ± 1,4 *	1,1 ± 0,2 *

Примечание - сокращения см. таблицу 29. *P≤0,05; $ P≤0,1 по сравнению с контрольными (фон) значениями (парный критерий Стьюдента).



Примечание - ИК-ипсилатеральная кора, КК-контрлатеральная кора, ГПК-гиппокамп, ГПТ-гипоталамус.

Рисунок 27 – Электрограммы структур мозга крыс с кобальтовой эпилепсией до и после введения леветирацетама в дозе 200 мг/кг на 2-й стадии формирования Эпи системы

Таким образом, установлено, что при введении леветирацетама в дозе 200 мг/кг животным с 1-й стадией развития Эпи системы наблюдается снижение (на уровне тенденции) как числа, так и продолжительности разрядов ЭпА в ипсилатеральной коре. Статистическое снижение подавление пароксизмальной активности во всех исследуемых структурах мозга крыс с кобальтовой эпилепсией наблюдается при введении леветирацетама на 2-й стадии развития Эпи системы, где проявляется выраженное влияние на вторично генерализованные очаги эпилептиформной активности. При этом наибольшая выраженность противосудорожного эффекта проявляется в гиппокампе.

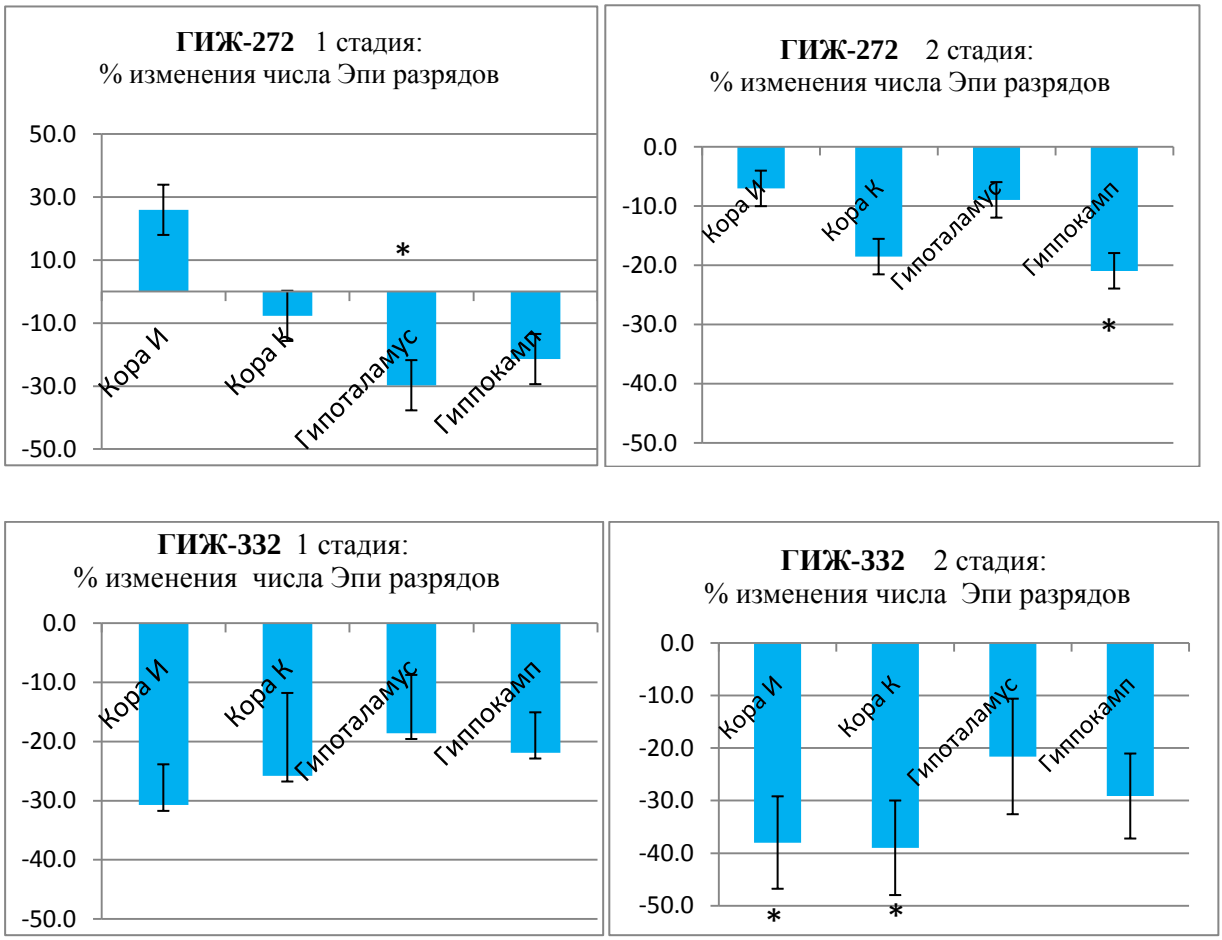
Выявление ЭЭГ мишеней (структуры мозга) действия соединений ГИЖ- 272 и ГИЖ-332.

Структуры-мишени для соединений ГИЖ-272 и ГИЖ-332 определяли с помощью программы «Brainsys» на двух стадиях развития Эпи системы у крыс с кобальт-индуцированным Эпи очагом, моделирование которого проводили согласно методическим рекомендациям (раздел «Материалы и методы»). Доминантную (ведущую) структуру-мишень для соединений определяли по наибольшему подавлению ЭпА (число и длительность разрядов).

Электрофизиологический механизм действия ГИЖ-272 (40 мг/кг) определяется влиянием на подкорковые структуры мозга: соединение подавляет очаги ЭпА в гипоталамусе

на 1 стадии развития Эпи системы и в гиппокампе на 2 стадии развития Эпи системы, уменьшая число и длительность разрядов (рисунок 28).

Структурными мишенями ГИЖ-332 (10 мг/кг) являются ипси- и контрлатеральная кора: соединение оказывает наиболее выраженный эффект на очаги ЭпА на 2-й стадии развития Эпи системы в кортикограммах (рисунок 28).



Примечание - Кора И – ипсилатеральная кора; Кора К - контрлатеральная кора; *P≤0,05 по сравнению с фоном (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 28 – Степень изменения (%) числа разрядов в различных структурах мозга у крыс с кобальт-индуцированным очагом под влиянием ГИЖ-272 и ГИЖ332 на 1 и 2 стадиях формирования Эпи системы

Таким образом, на модели хронической фокальной эпилепсии установлены структурные мишени противосудорожного действия соединений: ипси- и контрлатеральная кора для ГИЖ-332, а гиппокамп и гипоталамус для ГИЖ-272.

6.2 Исследование влияния ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на аудиогенные судороги крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ) с генетически детерминированной аудиогенной эпилепсией

С целью исследования влияния ГИЖ-332 и ГИЖ-272 на аудиогенные судороги были использованы крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ) с генетически детерминированной аудиогенной эпилепсией в возрасте 4 месяцев.

Показано, что акустический стимул (120 дБ) вызывал у крыс КМ начальные поведенческие судорожные эпизоды в виде двигательного возбуждения («дикий бег») с последующим развитием генерализованных тонико-клонических судорожных реакций с экстензией передних и задних конечностей (таблица 35).

Соединение ГИЖ-332 (20 мг/кг) статистически достоверно не влияло на регистрируемые показатели судорожной активности крыс линии КМ (латентный период наступления судорог, выраженность судорог в баллах и процент крыс с тонической экстензией) в отличие от препарата сравнения леветирацетама, который значительно снижал тяжесть судорожных проявлений крыс КМ, полностью устраняя тоническую экстензию конечностей (таблица 35).

Соединение ГИЖ-272 (40 мг/кг) со статистической достоверностью задерживало развитие тонико-клонических судорог и способствовало снижению выраженности судорожных реакций в баллах, устраняя у части животных тоническую фазу судорог (таблица 35).

Таблица 35 - Влияние ГИЖ-332 ГИЖ-272 и леветирацетама на аудиогенные судороги у крыс Крушинского-Молодкиной (КМ)

Группа животных	Доза, мг/кг	Выраженность судорог в баллах	ЛП судорог	% крыс с тонической экстензией передних и задних конечностей
Контроль	-	3,17 ± 0,4	25,00 ± 8,3	50 (3/6)
ГИЖ-332	20	2,67 ± 0,3	30,83 ± 8,8	16,7 (1/6)
Леветирацетам	200	1,67 ± 0,2*	70,83 ± 6,3*	0 (0/6)#
Контроль	-	4,00 ± 0,00	14,00 ± 2.43	100 (6/6)
ГИЖ-272	40	2,2 ± 0,82 p=0.08	52,20 ± 14.21*	33 (2/6) p=0.06

Примечание: - * - достоверность отличий от контрольной группы, при $P \leq 0.05$ (критерий Краскела - Уоллиса); #- достоверность отличий от контрольной группы, при $P \leq 0.05$ (точный критерий Фишера); Балл 0 – отсутствие ДВ (двигательная волна) на звук, балл 1 – ДВ, балл 2 – клонус всего тела, балл 3 – клонико-тонические судороги (на боку), балл 4 – тонические судороги с остановкой дыхании.

Таким образом, ГИЖ-272 и леветирацетам в модели генетически детерминированной эпилепсии, у крыс линии Крушинского-Молодкиной, устраняют эпилептическую активность, вызванную акустическим стимулом. ГИЖ-272 уступает леветирацетаму по выраженности эффекта, но превосходит его по активности.

6.3 Изучение противогипоксических эффектов ГИЖ-332 и ГИЖ-272 на острых моделях гипоксии у мышей

При эпилептических припадках гипоксия играет особую, критическую роль. Истощение антиоксидантной защиты, возникающее при судорогах, приводит к расстройству транспорта ионов и к пароксизмальному деполяризационному сдвигу [5]. В свою очередь, нарушения энергетического баланса и структурно-метаболические нарушения, возникающие в мозге при судорогах, еще больше приводят к эпилептизации ткани. Целью исследования было изучить возможные противогипоксические свойства ГИЖ-272 и ГИЖ-332, предсказанные по программе PASS. По программе PASS производные оксимов дибензофуранона обладают противоишемической (Pa=0.65-0.75) и мембранопротекторной (Pa=0.73-0.93) активностями. В исследовании использовали беспородных мышей самцов, массой 23-25 г. Противогипоксическое действие соединений ГИЖ-272 и ГИЖ-332 изучали в условиях методик нормобарической и гемической гипоксий, изложенных в разделе «Материалы и методы». Критерием оценки антигипоксического действия исследуемых веществ является увеличение времени жизни животных опытных групп по сравнению с контрольной.

При изучении противогипоксических эффектов ГИЖ 272 (20, 40 и 60 мг/кг) и ГИЖ-332 (20 и 40 мг/кг) в модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме установлено, что соединения не вызывали увеличение продолжительности жизни мышей по сравнению с контрольной группой (таблица 36).

Установлено, что на модели гемической гипоксии, вызванной нитритом натрия (170 мг/кг), соединение ГИЖ-272 в диапазоне доз 10 - 60 мг/кг увеличивало продолжительность жизни мышей относительно контрольных значений, достигшее статистической достоверности в дозе 60 мг/кг. Увеличение жизни животных составило 9 минут (таблица 36).

Соединения ГИЖ-332 в дозах 5 и 60 мг/кг не увеличивало продолжительность жизни мышей в условиях гемической гипоксии (таблица 36).

Таблица 36 – Влияние соединений ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на продолжительность жизни мышей в условиях модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме и гемической гипоксии

Группа животных	Доза, мг/кг	Время, мин
Нормобарическая гипоксия		
Контроль	-	26,8±1,1
ГИЖ-272	20	25,2±4,1
	40	26,4±2,2
	60	25,2±4,1
Контроль	-	21,8±2,2
ГИЖ-332	20	24,0±5,0
	40	22,6±4,4
Гемическая гипоксия		
Контроль (нитрит натрия)	-	30,9 ± 1,6
ГИЖ-272	10	32,9 ± 4,4
	30	35,6 ± 4,9
	60	39,3 ± 3,2*
Контроль	-	38,8 ± 3,6
ГИЖ-332	5	40,6 ± 1,9
	60	39,2 ± 2,2

Примечание - *P≤0,05 по сравнению с контрольной группой (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).

Таким образом, ГИЖ-272 (60 мг/кг) обладает противогипоксической активностью в условиях теста гемической гипоксии и не влияет на время жизни животных в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме. Соединение ГИЖ-332 не обладает противогипоксической активностью в условиях нормобарической и гемической моделях гипоксии.

Заключение

Соединение ГИЖ-272 (40 мг/кг) на модели хронической очаговой эпилепсии, индуцированной кобальтом, оказывает выраженный противосудорожный эффект на 1-й (в гипоталамусе) и 2-й (в гиппокампе) стадиях развития Эпи системы, тогда как ГИЖ-332 (20

мг/кг) преимущественно воздействуют на подкорковые очаги ЭпА, сформированные на 2й стабильной стадии развития Эпи системы.

Соединение ГИЖ-332 (40 мг/кг/однократно) не влияет на тонико-клонические судороги, вызванные аудиогенным стимулом (120 дБ) у линейных крыс Крушинского-Молодкиной (КМ). Отсутствие противосудорожного эффекта ГИЖ-332 на крысах линии КМ может быть обусловлено тем, что ЭпА у этих животных, по данным литературы, не распространяется выше среднего мозга [71], в то время как структуры воздействия для ГИЖ-332 преимущественно корковые.

ГИЖ-272 (20 мг/кг/однократно), как и леветирацетам (200 мг/кг/однократно), задерживает развитие генерализованных тонико-клонических судорог у крыс КМ и способствует снижению количества животных с тонической экстензией конечностей. ГИЖ-272 уступает леветирацетаму по выраженности противосудорожного эффекта у крыс КМ, но превосходит его по активности.

Соединение ГИЖ-272 (60 мг/кг/однократно) обладает противогипоксической активностью в условиях гипоксии, обусловленной снижением способности гемоглобина эритроцитов связывать, транспортировать и отдавать кислород вследствие образования метгемоглобина (гемическая гипоксия) и не влияет на гипоксию, вызванную уменьшением напряжения кислорода в плазме артериальной крови (нормобарическая гипоксия).

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:

Литвинова С.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А., Кутепова И.С., Жмуренко Л.А. Нейропротективные свойства производного фурана — соединения ГИЖ-276 на модели геморрагического инсульта [Текст]/ ***Литвинова С.А.,*** *Золотов Н.Н., Воронина Т.А., Кутепова И.С., Жмуренко Л.А. // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – № 3. – С. 31-33 [57].*

Литвинова, С. А. Особенности действия леветинола на развитие судорожной активности у крыс с кобальт-индуцированной хронической эпилепсией [Текст]/ ***С. А. Литвинова,*** *Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова, И. С. Кутепова, Г. Г. Авакян, Г. Н. Авакян // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2018. – Т. 10, №. 1. – С. 52-62 [59].*

Литвинова, С. А. Сравнение эффектов и электрофизиологических механизмов действия вальпроевой кислоты и леветирацетама на экспериментальной модели очаговой эпилепсии [Текст] / ***С. А. Литвинова****, Г. Г. Авакян, Т. А. Воронина, И. О. Гайдуков, Л. Н. Неробкова*, И. С. Кутепова, *Г. Н. Авакян // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2018. – Т. 12, №. 3. – С. 45-52 [58].*

*Litvinova S. A. Levetiracetam effect and electrophysiological mechanism of action in rats with cobalt-induced chronic epilepsy [Текст] / **S. A. Litvinova,** T. A Voronina, L. N. Nerobkova, I. S. Kutepova, G.G. Avakyan, G.N. Avakyan // European journal of pharmacology. – 2019. – Vol. 854. – P. 380-386 [246].*

*Кутепова И.С. Исследование противоэпилептической активности производных оксима дибензофурана на модели фокальной эпилепсии [Текст] / И.С. Кутепова, С.А. **Литвинова, Т.А.** Воронина, А.А. Петрунина, Н.А. Гладышева, М.Д. Кондратова, Л.А. Жмуренко // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2019. – Т. 9, №. 7. – С. 275 [52].*

*Кутепова И.С. Противосудорожная активность производных дибензофурана в эксперименте [Текст] / И.С. Кутепова, **С.А. Литвинова**, Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова, Г. В. Мокров, Л.А. Жмуренко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. - № 8. – С. 3-8 [53].*

*Жмуренко Л.А. Синтез, противосудорожная, антигипоксическая и противоишемическая активность производных оксима дибензофуранона [Текст] / Жмуренко Л.А., **Литвинова С.А.,** Кутепова И.С., Неробкова Л.Н., Мокров Г.В., Ребеко А.Г., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 11. – С. 9-16 [31].*

*Кутепова, И. С. Исследование нового производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на моделях очаговой эпилепсии и интрацеребральной посттравматической гематомы [Текст] / Кутепова, И. С., **Литвинова, С. А.,** Воронина, Т. А., Жмуренко, Л. А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. - 83(9), 3-8 [54].*

*Кутепова И.С.Особенности спектра противосудорожной активности соединения ГИЖ-332 (производное дибензофуранона) в зависимости от локализации доминантного очага [Текст] / Кутепова И.С., **Литвинова С.А.,** Воронина Т.А., Яковлева А.А., Гладышева Н.А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2021. Т. 84. № 10. С. 3-9 [55].*

Глава 7 Исследование нейропротекторного, противоишемического действия лидерных соединений из ряда оксимов дибензофуранона - ГИЖ-272 и ГИЖ-332 в моделях церебральных поражений - глобальной ишемии и посттравматической гематомы мозга крыс

Сосудистые заболевания и травмы мозга являются одним из ключевых факторов увеличения доли больных эпилепсией. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения за счет постинсультных и посттравматических осложнений число больных эпилепсией ежегодно увеличивается на 4 млн, при этом высокая доля развития постинсультных эпилепсий (ПИЭ) выявляется у детей и пациентов старше 60 лет. Гибель нейронов головного мозга в результате инсульта и черепно-мозговых травм может приводить к развитию хронической эпилепсии, вследствие снижения порога нейрональной возбудимости и аберрантной реорганизации нейрональных сетей. Риск развития постинсультной эпилепсии увеличивается при корковом расположении очага, при тяжелых инсультах и при геморрагической трансформации ишемического инсульта [187, 299, 325]

Наиболее часто назначаемыми препаратами при постинсультной эпилепсии являются карбамазепин, леветирацетам, вальпроевая кислота и фенитоин [177, 347]. На основании российских исследований было показано, что на фоне приема леветирацетама у пациентов с постинсультной эпилепсией отмечалась редукция приступов более чем у 50% пациентов [63]. Целью данного раздела исследования было изучение возможных нейропротективных, противоишемических эффектов соединений ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на двух моделях церебральных поражений - глобальной ишемии мозга (ишемический инсульт, ИИ) и интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагический инсульт, ГИ) в сравнительном аспекте с леветирацетамом. Эксперименты проводили на аутбредных крысах самцах, массой 240 — 260 г., согласно методикам, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований» (2012) [66]. Подробные протоколы описаны в разделе «Материалы и методы».

7.1 Изучение противоишемических свойств ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на модели глобальной ишемии мозга

Для моделирования глобальной ишемии мозга проводили одномоментную двустороннюю перевязку общих сонных артерий до места бифуркации (модель глобальной ишемии). Для ложно оперированных животных (ЛО) проводили аналогичные операционные манипуляции, но без перевязки сонных артерий. Соединения ГИЖ-272 и ГИЖ-332 вводили через 2 – 3 часа после операции в дозе 10 мг/кг и далее один раз в сутки в течение 6 дней (всего 7 дней). Выживание животных после операции и развитие неврологического дефицита (Stroke-

index McGrow в модификации Ганушкиной (Ганушкина, 1998)) регистрировали в течение 14 дней: 0- (7-8 часов после операции), 1- (через 24 часа) и на 2-, 3-, 7- и 14-е сутки после операции.

Исследование влияния ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на неврологический дефицит и гибель животных с ИП

В группе ложно оперированных (ЛО) животных не наблюдалось гибели и каких-либо неврологических нарушений в течение всего времени наблюдения (таблицы 37, 38). Гибель животных в контрольной группе с ИИ за первые 3 дня после операции составляла около 55%, которая увеличивалась максимально до 72% к 14-м суткам после операции (таблица 37).

ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) защищал животных от гибели в день операции (0 сутки), при этом в контрольной группе с ИИ погибло 6 животных (21%). Соединение ГИЖ-272 при повторном введении (6 дней) на 30% ($p \leq 0,1$) увеличивало количество выживших крыс к 7-м суткам послеоперационного периода и на 33% ($p \leq 0,05$) - к 14-м суткам регистрации относительно контрольной группы (таблица 37).

ГИЖ-332 (10 мг/кг) при курсовом введении животным в течение 7 дней после операции не защищал от гибели в течение 14 дней регистрации постишемической динамики (таблицы 37).

Леветирацетам в дозе 100 мг/кг при 7 дневном введении не оказывал эффекта на выживаемость животных на протяжении всего эксперимента. На 14 сутки погибло сопоставимое с контрольной группой количество крыс, которое составило 69% (таблица 37).

Таблица 37 – Влияние соединений ГИЖ-272, ГИЖ-332 и леветирацетама на выживаемость крыс после глобальной ишемии, модели ишемического повреждения (ИИ)

Группа животных	Доза, мг/кг	Гибель животных в % (число погибших к концу суток/число в группе) на:					
		0-е сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки
Контроль ЛО	-	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)
Контроль ИИ	-	21 (6/29)	31 (9/29)	38 (11/29)$^{@}$	55 (16/29) #	69 (20/29) #	72 (21/29)#
ИИ+Леветирацетам	100	8 (1/13)	23 (3/13)	38 (5/13)	46 (6/13)	61 (8/13)	69 (9/13)
ИИ+ ГИЖ-272	10	0 (0/18)$^{\$}$ p=0,069	11 (2/18)	28 (5/18)	33 (6/18)	39 (7/18)$^{\$}$ p=0,069	39 (7/18)*
ИИ+ ГИЖ-332	10	11 (3/9)	33 (5/9)	67 (6/9)	78 (7/9)	78 (7/9)	78 (7/9)

Примечание – *$P \leq 0,05$ и \$ $P \leq 0,1$ по сравнению с группой контроля с ИИ; # $P \leq 0,05$ и @ $P \leq 0,1$ по сравнению с группой ЛО (точный критерий Фишера).

При изучении неврологического дефицита по шкале Stroke-index McGrow в модификации Ганушкиной показано, что на 1-е сутки после операции у 100% крыс контрольной группы с ишемией развиваются неврологические нарушения различной степени тяжести. Слабость конечностей, которую оценивали по неспособности животных подтянуть себя на перекладине и отсутствия тонуса задних конечностей, наблюдалась у 75-88% животных контрольных групп. Среди тяжелых нарушений в 1 сутки ИИ отмечались манежные движения и парезы конечностей - у 20-25% крыс. К 7-м суткам ИИ у большей части крыс наблюдались птозы различной степени выраженности, слабость конечностей. Тяжелые неврологические нарушения, проявляющиеся в виде манежных движений, парезов и параличей конечностей, регистрировались у 33% животных (таблица 38). Такие животные, не получавшие терапию, впоследствии погибали. К 14 суткам у оставшихся в живых крыс контрольной группы оставалась легкая неврологическая симптоматика, основными из которых было наличие птозов и полуптозов (таблица 38).

ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) достоверно защищал от развития тяжелых неврологических нарушений, что способствовало уменьшению количества животных с манежными движениями и парезами конечностей на 1 сутки после ИИ, а также ослаблению легкой неврологической симптоматики (птозы и слабость конечностей) на 1 и 7 сутки наблюдений (таблица 38). Так как к 14 суткам после ИИ животные с тяжелыми неврологическими нарушениями из контрольной группы погибли, различий по неврологическому дефициту между группой лечения с ГИЖ-272 не выявлено (таблица 38).

ГИЖ-332 при курсовом введении животным в течение 7 дней после операции не ослаблял неврологический дефицит в течение 14 дней регистрации постишемической динамики (таблицы 38).

При оценке неврологического дефицита группы крыс, получившей леветирацетам (100 мг/кг/7 дней) было отмечено, что препарат способствовал регрессу неврологических расстройств в сторону более легких на 1 и 7 сутки регистрации. До нулевых значений снизилось количество крыс с манежными движениями, парезами и параличами конечностей. У выживших к 7 суткам животных наблюдались односторонние птозы и полуптозы, слабость конечностей, тогда как в контрольной группе 78% крыс имели двусторонние п/птозы и у 33% крыс регистрировались парезы конечностей (таблица 38).

Таблица 38 – Влияние соединений ГИЖ-272, ГИЖ-332 и леветирацетама на показатели неврологического дефицита (по шкале McGrow) у крыс на 1, 7 и 14 сутки после моделирования ишемического инсульта (ИИ)

Группа животных	Количество (%) крыс с нарушениями/число в группе								
	Неврологические показатели:								
	вялость, замедлен-ность движе-ний	слабость конеч-ностей	одно-сторонний п/птоз	двусто-ронний п/птоз	одно-сторонний птоз	двусто-ронний птоз	манеж-ные движени я	парез конеч-ностей 1-4	паралич конеч-ностей 1-4
1 сутки после ИИ									
Контроль ЛО	60 (6/10)	40 (4/10)	0	0	0	0	0	0	0
Контроль ИИ	80 (16/20)	75 (15/20)	75 (15/20)	20 (4/20)	20 (4/20)	20 (4/20)	20 (4/20)	20 (4/20)	0
ИИ+ Левети-рацетам	92 (12/13)	77 (10/13)	23 (3/13)	15,4 (2/13)	38,5 (5/13)	31 (4/13)	0	0	0
ИИ+ ГИЖ-272	31* (5/16)	31* (5/16)	0*	19 (3/16)	12,5 (2/16)	0	0	0	0
ИИ+ ГИЖ-332	50 (2/4)	50 (2/4)	75 (3/4)	0	0	0	25 (1/4)	0	0
7 сутки после ИИ									
Контроль ЛО	0 (0/10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Контроль ИИ	33 (3/9)	33 (3/9)	22 (2/9)	78 (7/9)	0	0	0	33# (3/9)	0
ИИ+ Левети-рацетам	28,6 (2/7)	28,6 (2/7)	43 (3/7)	0	28,6 (2/7)	14,3 (1/7)	0	0	0
ИИ+ ГИЖ-272	18 (2/11)	0* (0/11)	18 (2/11)	18* (2/11)	0	0	9 (1/11)	9 (1/11)	0
ИИ+ ГИЖ-332	50 (1/2)	0	0	0	0	0	0	0	0
14 сутки после ИИ									
Контроль ЛО	0 (0/10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Контроль ИИ	0 (0/8)	0	0	0	0	25 (2/8)	0	0	0
ИИ+ Левети-рацетам	25 (1/4)	0	50 (2/4)	0	0	0	0	0	0
ИИ+ ГИЖ-272	18 (2/11)	18 (2/11)	18 (2/11)	0	0	18 (2/11)	0	0	0
ИИ+ ГИЖ-332	0 (0/2)	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание – *P≤0,05 по сравнению с группой контроля с ИИ; # P≤0,05 по сравнению с группой ЛО (точный критерий Фишера).

Таким образом, выраженным защитным эффектом на модели ишемического повреждения обладает соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг, однократно и курс 7 дней), которое увеличивает количество выживших крыс на 33% по сравнению с контрольными значениями группы с ИИ. Соединение ГИЖ-272 значимо ослабляет неврологический дефицит и снижает количество крыс с тяжелыми неврологическими нарушениями. ГИЖ-332 и леветирацетам не защищают от гибели животных после перевязки сонных артерий и не способствуют значимому устранению постинсультных неврологических осложнений.

Изучение влияния соединений ГИЖ272, ГИЖ-332 и леветирацетама на координацию движений после ИИ в тесте «Вращающийся стержень»

Для оценки сенсомоторной координации, силы, выносливости после моделирования ИИ был использован тест «Вращающегося стержня». Исследование динамики нарушений координации движений у крыс с ИИ головного мозга показало, что на 1-е сутки после повреждения у животных контрольной группы отмечалось сокращение времени (в 3 раза) удержания на вращающемся стержне по сравнению с ЛО животными. К 14 суткам количество падений крыс из группы ЛО было равно нулю, при этом в контрольной группе с ИИ отмечалось в среднем 1-2 падения за наблюдаемый период эксперимента (2 минуты) (таблица 39).

У животных, получавших соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней), наблюдалась выраженная позитивная динамика восстановления мышечной силы и координации движений. Так на 1-е и 3-и сутки ИИ количество падений было значительно меньше, чем в контрольной группе и сопоставимо с показателями группы ЛО (таблица 39).

ГИЖ-332 (10 мг/кг/7 дней) не оказывал значимого влияния на поведение животных с ИИ в тесте «Вращающийся стержень» (таблица 39).

Леветирацетам (100 мг/кг/7дней) способствовал увеличению падения животных со стержня через 24 часа после ИИ. У всех животных в группе количество падений было максимальным и составляло 10 (таблица 39). Увеличение падений со стержня относительно как ЛО животных, так и контрольной группы с ИИ может свидетельствовать о седативных свойствах леветирацетама (таблица 39).

Таблица 39 – Изучение влияния ГИЖ272, ГИЖ-332 и леветирацетама на координацию движений после ИИ в тесте «Вращающийся стержень»

Группа животных	Доза, мг/кг	Количество падений животных в группе в течение 2 минут, вращение стержня 10 об/мин		
		1-е сутки	3-е сутки	7-е сутки
Контроль ЛО	-	1,0 (1,0 -2,5)	1,0 (1,0 -2,0)	0,5 (0,0 - 2,0)
Контроль ИИ	-	3,0# (2,0 - 3,0)	3,0# (1,5 - 6,8)	2,0 (1,0 - 2,3)
ИИ+Леветирацетам	100	10,0* (10,0 - 10,0)	2,0 (1,0 - 4,5)	2,0 (0,0 - 3,5)
ИИ+ГИЖ-272	10	2,0* (1,2 - 2,0)	1,0* (0,0 - 2,8)	0,0 (0,0 - 0,8)
ИИ+ГИЖ-332	10	2,0 (1,0 - 4,0)	2,0 (1,0 - 3,0)	1,0 (1,0 - 2,0)

Примечание – *P≤0,05 по сравнению с группой контроля с ИИ; # p≤0,05 по сравнению с группой ЛО (критерий Краскела-Уоллиса с переходом на множественные сравнения).

Изучение влияния соединений ГИЖ-272, ГИЖ-332 и леветирацетама на когнитивные нарушения крыс с ИИ в Y-образном лабиринте

На 5 и 6 день у крыс с ИИ изучали поведение в Y-образном лабиринте, который позволяет оценить мотивацию животных к исследованию новых объектов – нового, ранее не исследованного рукава «С».

Установлено, что в группе контрольных животных с ИИ наблюдалось нарушение способности к исследованию нового рукава Y-образного лабиринта, что выражалось в значимом снижении (в 2 раза) времени нахождения в ранее не обследованном рукаве «С» (таблицы 40).

Соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней) в 2 раза увеличивало продолжительность нахождения крыс в «новом» рукаве «С» установки относительно показателей контрольной группы с ИИ (таблица 40).

Леветирацетам (100 мг/кг/7 дней) не вызывал статистически значимых различий поведения в Y -образном лабиринте относительно контрольной группы с ИИ (таблица 40).

Таблица 40 – Влияние ГИЖ272, ГИЖ-332 и леветирацетама на когнитивные нарушения животных с ИИ в Y-образном лабиринте на 6 сутки после операции

Группы животных	Доза, мг/кг	Время нахождения в рукавах:			Время нахождения в центральном отсеке	Доля времени нахождения в отсеке "С" за 5 мин, %
		A	B	C		
ЛО (n=10)	-	86,0±19,6	76,6± 13,9	65,3±8,9	72,1±21,9	21,8±2,9
ИИ (n=9)	-	144,0±22,8	50,9±12,5	31,2±7,6$^{\#}$	73,9±18,1	10,4±2,5$^{\#}$
ИИ+ Левети рацетам (n=7)	100	128,2±24,4	63,8± 12,5	46,4± 15,3	61,6±11,9	15,5± 4,7
ИИ+ ГИЖ-272 (n=9)	10	131,7±12,7	27,5±6,7	63,3±9,9*	77,5±17,7	21,1±3,3*

Примечание – *P≤0,05 по сравнению с группой контроля; # p ≤ 0,05 по сравнению с группой ЛО (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета).

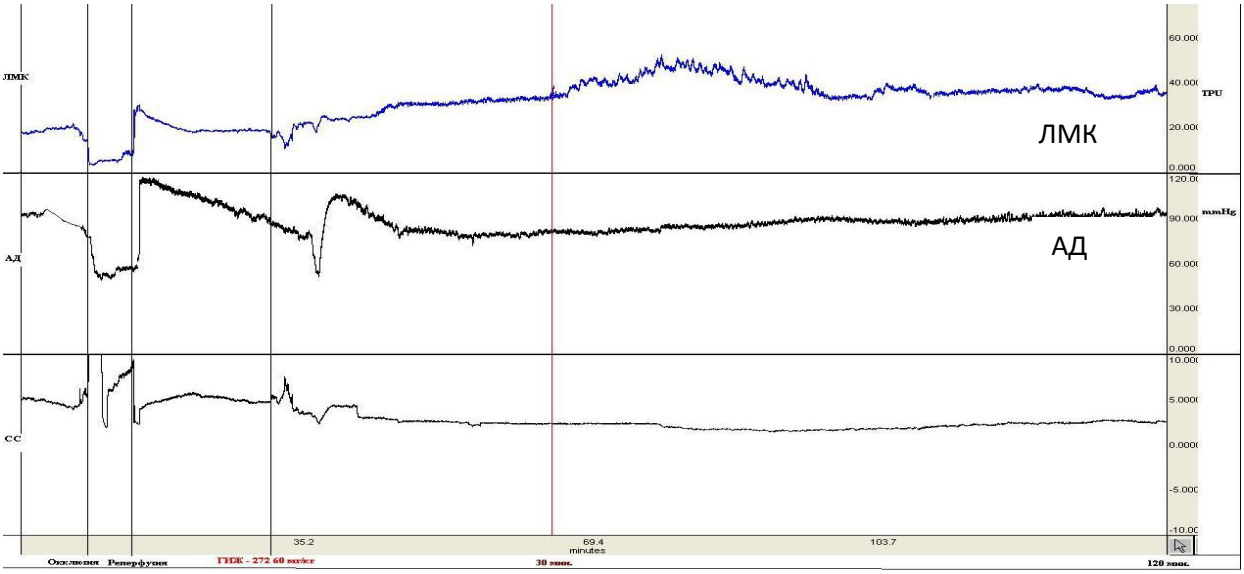
Таким образом, противоишемическим эффектом на модели глобальной ишемии среди исследованных лидерных соединений производных дибензофуранона обладает соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг /7дней), которое защищает животных от гибели, ослабляет неврологические и моторные нарушения и восстанавливает когнитивные функции у животных с ИИ. Препарат сравнения леветирацетам (100 мг/кг /7дней) не защищает животных от гибели и не способствует устранению неврологических, моторных и когнитивных расстройств, однако, препарат умеренно ослабляет тяжелые неврологические последствия глобальной ишемии мозга.

7.2 Исследование влияния соединения ГИЖ-272 на мозговой кровоток в условиях глобальной преходящей ишемии

Целью исследование было изучить возможный цереброваскулярный компонент действия в структуре противосудорожного эффекта ГИЖ-272.

Исследование ГИЖ-272 (в дозе 60 мг/кг) на локальный мозговой кровоток (ЛМК) проводили у наркотизированных крыс в течение 2 часов после моделирования глобальной преходящей ишемии (протокол которого изложен в разделе «Материалы и методы»). Дозу подбирали принимая во внимание результаты, полученные при изучении антигипоксических свойств ГИЖ-272, которые позволили установить, что значимая эффективность соединения проявлялась в дозе 60 мг/кг. Состояние мозгового кровообращения у животных оценивали с помощью метода лазерной допплеровской флоуметрии, изложенного в разделе «Материалы и методы».

Соединение ГИЖ-272 (60 мг/кг) к 30 минуте после введения вызывает увеличение ЛМК в коре мозга крыс на 65%, затем немного снижается и к концу эксперимента составляет в среднем 24% от уровня ЛМК, наблюдаемого после ишемии. Следует отметить, что в этих опытах уровень артериального давления практически не менялся (рисунок 29, таблица 41).



Примечание - сверху вниз - локальный мозговой кровоток (ЛМК), артериальное давление (АД) в бедренной артерии, расчетное сопротивление, отметка времени и введения препарата.

Рисунок 29 – Влияние ГИЖ-272 (60 мг/кг, в/в) на локальный мозговой кровоток (ЛМК) и артериальное давление у наркотизированной крысы, после глобальной преходящей ишемии

Таблица 41 – Влияние ГИЖ-272 на локальный мозговой кровоток (в условных единицах- у.е. и %, медиана) и артериальное давление (в мм рт. ст. и %, медиана) наркотизированных крыс после глобальной преходящей ишемии

		Локальный мозговой кровоток (ЛМК)	Артериальное давление (АД)
До ишемии (Фон, Ф1)		27	83
После ишемии	у.е.	6#	48#
	% к ф1	-77,1	-46,7
После реперфузии	у.е.	51#	92#
	% к ф1	74	13,6
40 мин после реперфузии (Фон, Ф2)	у.е.	18#	80#
	% к ф1	-14,1	-6,8
Время после введения соединений:		ГИЖ-272 (60 мг/кг)	
10 мин	у.е.	24*	88

Продолжение таблицы 41

10 мин	% к ф2	6,5	12,7
20 мин	у.е.	25*	87
	% к ф2	26,7	18,8
30 мин	у.е.	30*	86
	% к ф2	64,9	16,5
40 мин	у.е.	27*	84
	% к ф2	49,3	11,7
50 мин	у.е.	26*	84
	% к ф2	17,8	9,6
70 мин	у.е.	26*	85
	% к ф2	20,4	8,1
80 мин	у.е.	28*	85
	% к ф2	25,9	8,9
90 мин	у.е.	26*	81
	% к ф2	24,1	4,1

Примечание - # P≤ 0,05 к ф1; *P≤ 0,05 к ф2 .

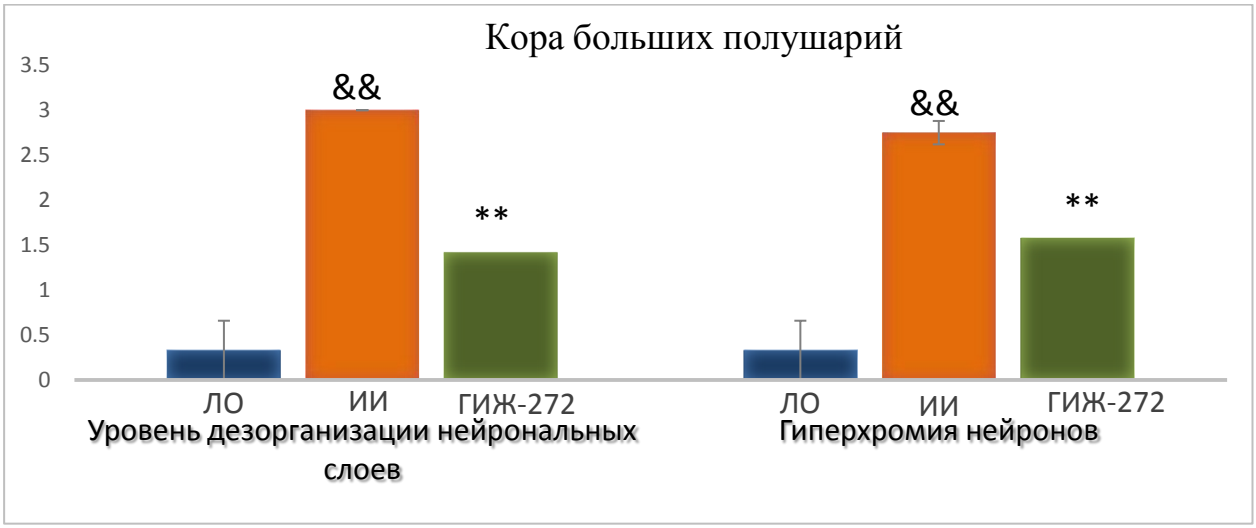
Таким образом, соединение ГИЖ-272 (60 мг/кг, в/в) обладает цереброваскулярными свойствами и вызывает увеличение локального мозгового кровотока у крыс, перенесших глобальную преходящую ишемию, на 65% через 30 минут и 24% через 90 минут.

7.3 Изучение влияния соединения ГИЖ-272 на выживаемость нейронов у крыс с глобальной ишемией мозга в гистологическом исследовании

Проведено гистологические исследования на 7 день после моделирования ишемии мозга. Установлено, что в контрольной группе с ишемией количество погибших, пикнотических нейронов возросло в несколько раз относительно животных группы ЛО (рисунок 30). При этом наблюдалось уменьшение гранулярного слоя коры и общая дезорганизация нейрональных слоев коры (рисунки 30, 31). На морфологических срезах коры группы крыс с ИИ визуализировали расширение периваскулярных и перинейрональных пространств, что свидетельствует об отеке мозга (рисунок 31).

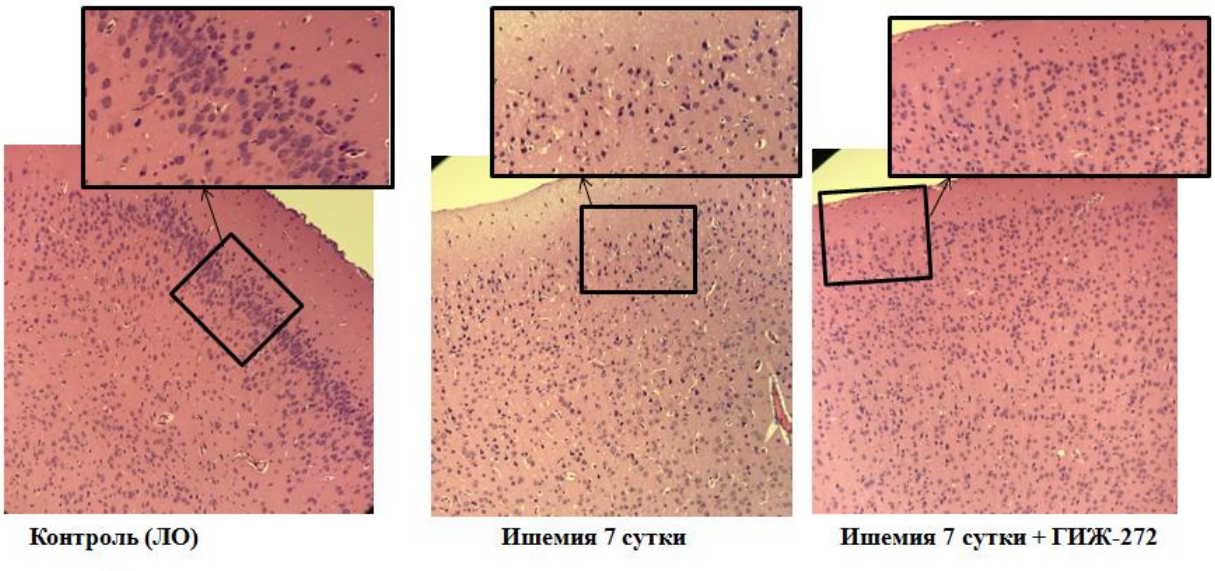
ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней) увеличивал выживаемость нейронов (в 2-3 раза) в коре больших полушарий, уменьшая количество сморщенных, пикнотических нейронов (рисунок

30). ГИЖ-272 способствовал сохранению гранулярного слоя коры и снижал уровень дезорганизации нейрональных слоев, а также снижал выраженность отека (рисунки 30, 31).



Примечания: кора больших полушарий на 7й день после ишемического инсульта (ИИ); окраска гематоксилином и эозином; по оси ординат представлены условные едицицы количественных изменений; &&- P≤0,01 по сравнению с группой контроля (ЛО), **- P≤0,01 по сравнению с группой ИИ (критерий Краскела-Уоллиса).

Рисунок 30 – Влияние ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) на количество погибших нейронов и уровень дезорганизации нейрональных слоев в коре больших полушарий

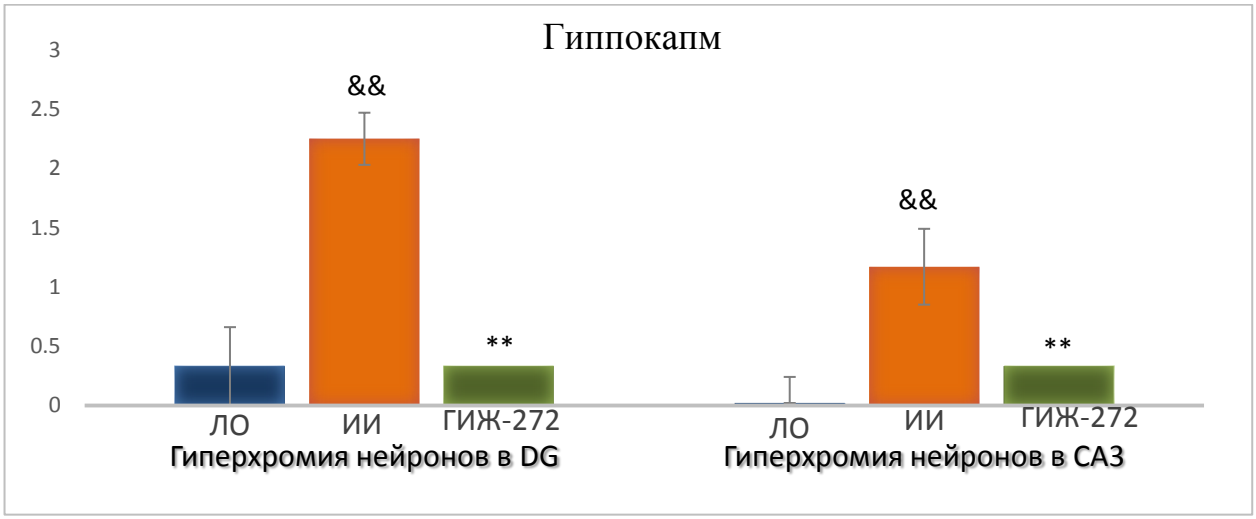


Примечание - окраска гематоксилином и эозином. Квадратиком выделен наружный гранулярный слой нервных клеток (2 слой). Ув. 20×10.

Рисунок 31 – Срезы коры больших полушарий крыс с ишемией (ИИ) на 7 сутки и влияние ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней)

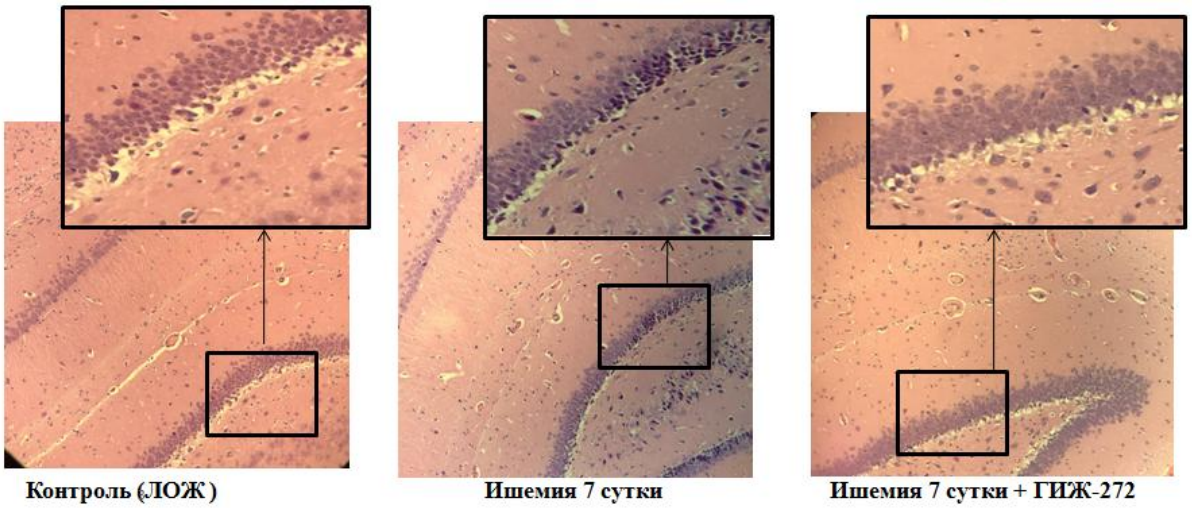
В гиппокампе контрольной группы крыс с ИИ на 7 сутки после операции количество погибших, пикнотических нейронов в зубчатой фасции гиппокампа (DG) увеличилось в 4,5 раза, а в поле СА3 – в 2 раза относительно животных группы ЛО (рисунки 32-34).

ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней) увеличивал выживаемость нейронов в DG, уменьшая количество погибших нейронов до значений крыс группы ЛО (рисунок 32). Также под влиянием ГИЖ-272 наблюдалось значительное увеличение выживших нейронов поля СА3 (рисунки 32-34).



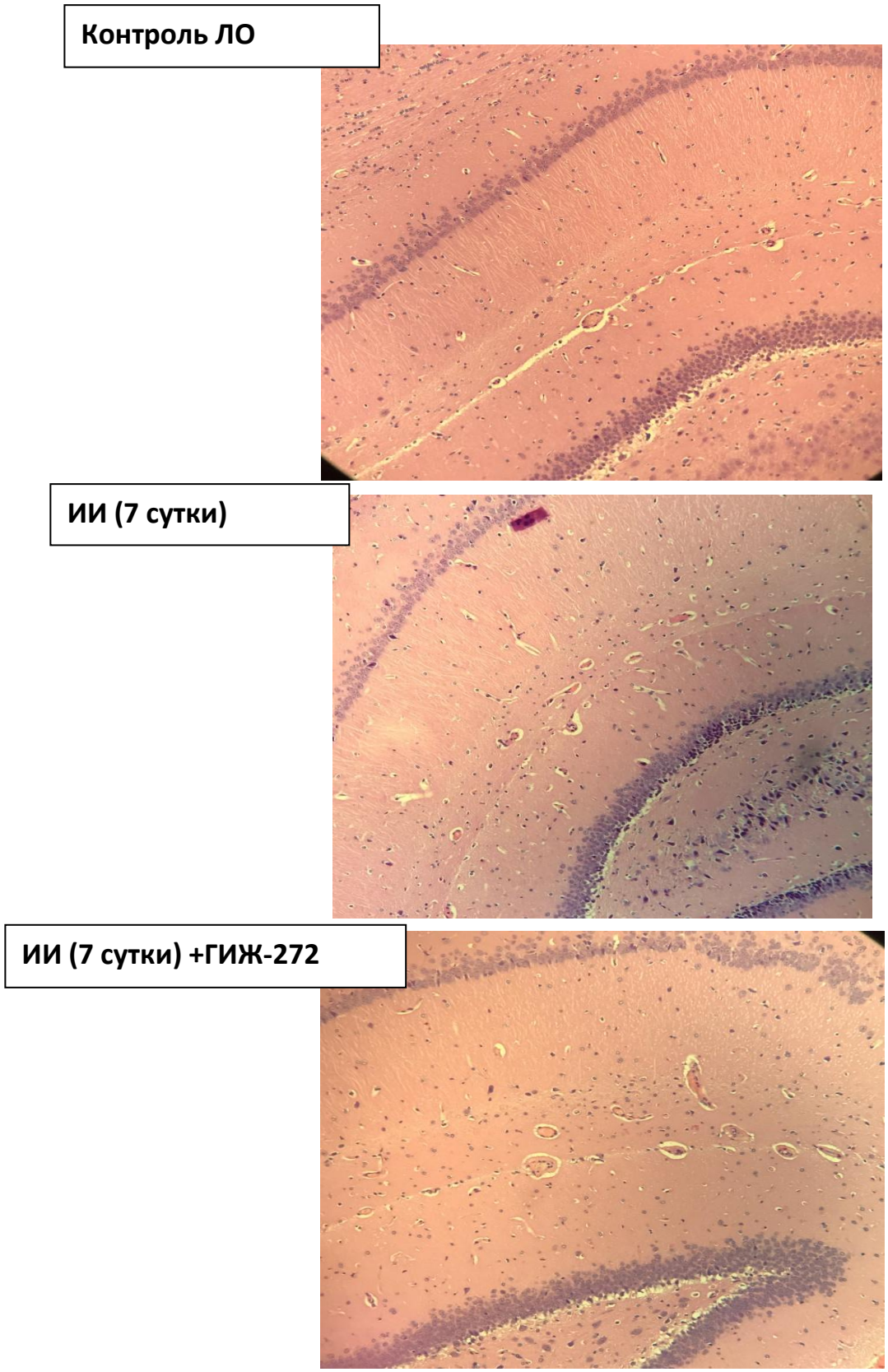
Примечания: гиппокамп на 7й день после ишемического инсульта (ИИ); окраска гематоксилином и эозином; по оси ординат представлены условные единицы количественных изменений; &&- p≤0,01 по сравнению с группой контроля (ЛО), **- p≤0,01 по сравнению с группой ИИ (критерий Краскела-Уоллиса).

Рисунок 32 – Влияние ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) на количество погибших нейронов в слоях поля СА3 и зубчатой фасции гиппокампа (DG)



Примечание - окраска гематоксилином и эозином. Квадратиком выделено поле С3.Ув. 20×10.

Рисунок 33 – Срезы гиппокампа крыс с ишемией (ИИ) на 7 сутки и влияние ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней)



Примечание - окраска гематоксилином и эозином. Квадратиком выделено поле С3.Ув. 20×10.

Рисунок 34 – Срезы гиппокампа крыс с ишемией (ИИ) на 7 сутки и влияние ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней)

Таким образом, соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней) вызывает увеличение количества выживших нейронов в коре больших полушарий и в гиппокампе крыс на 7 сутки после глобальной ишемии (ИИ) и предотвращает дезорганизацию нейрональных слоев коры больших полушарий.

7.4 Изучение эффектов ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на модели интрацеребральной посттравматической гематомы

Моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ), модели геморрагического инсульта (ГИ), осуществляли у крыс с помощью введения аутокрови в область внутренней капсулы интерна. Внутримозговая геморрагия приводит к стойкому понижению общего и локального мозгового кровотока, сопровождающегося в ряде случаев мозаично расположенными очагами гиперемии, и гипоксии мозговой ткани. Морфологические исследования показали, что таким способом достигается локальный аутогеморрагический латеральный инсульт в области внутренней капсулы без существенных повреждений выше расположенных образований мозга [64].

Соединения ГИЖ-272 (10 мг/кг) и ГИЖ-332 (10 мг/кг) вводили через 2 – 3 часа после операции и далее один раз в сутки в течение 6 дней (всего 7 дней). Выживание животных после операции и развитие неврологического дефицита (шкала McGrow в модификации Ганушкиной с использованием тестов «Вращающийся стержень» и «Перекладина») регистрировали в течение 21 дня: 1-, 3-, 7-, 14- и 21-е сутки после операции.

Исследование влияния ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на неврологический дефицит и гибель животных с геморрагическим инсультом

В контрольной группе крыс с ГИ гибель животных отмечалась к 3 суткам после операции в пределах 8% на группу. К 7 суткам с развитием постгеморрагических осложнений гибель нарастала и достигла 25%. К концу наблюдений, на 21 сутки после моделирования ГИ, гибель животных в контрольной группе составила 50% (таблица 42).

Соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) снижало гибель животных на 7, 14 и 21 сутки регистрации, что способствовало увеличению выживаемости крыс на 18%, 35% и 29% соответственно относительно значений контрольной группы с ГИ (таблица 42).

Соединение ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг при аналогичном режиме введения не обладало защитными свойствами, обеспечивающими выживание животных после ГИ (таблицы 42).

Таблица 42 – Влияние соединений ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на выживаемость крыс после интрацеребральной посттравматической гематомы, модели геморрагического инсульта (ГИ)

Группа животных	Доза, мг/кг	Гибель животных в % (число погибших/число в группе) на:			
		3-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Контроль ЛО	-	0 (0/17)	0 (0/17)	0 (0/17)	12 (2/17)
Контроль ГИ	-	8 (1/12)	25 (3/12) P=0,06	42 (5/12) #	50 (6/12) #
ГИ+ ГИЖ-272	10	0 (0/14)	7 (1/14)	7 (1/14) P=0,065	21 (3/14)
ГИ+ ГИЖ-332	10	0 (0/10)	20 (2/10)	40 (4/10)	50 (5/10)

Примечание – *p≤0,05 по сравнению с группой контроля с ГИ; # P≤0,05 по сравнению с группой ЛО (точный критерий Фишера).

При исследовании неврологического дефицита животных с ГИ контрольной группы, получавших физиологический раствор, на 1-е сутки после операции выявлено наличие множества неврологических нарушений. Среди легких неврологических нарушений наблюдалась вялость и замедленность движений (у 75%), слабость конечностей (67%), одно- и двусторонние полуптозы. Отмечалось появление тяжелых неврологических нарушений, таких как парезы конечностей (у 17%). У оставшихся крыс к 7 суткам после ГИ наблюдалось усиление тяжести неврологического дефицита, вследствие распада гемоглобина, что совпадает с клиническими характеристиками течения геморрагического инсульта в этот временной интервал. К концу наблюдений, на 21 сутки, в контрольной группе крыс с ГИ оставались животные с нарушениями тяжелой симптоматики (таблица 43).

ГИЖ-272 значимо уменьшал выраженность легких неврологических нарушений и предотвращал развитие тяжелых неврологические проявлений. Среди нарушений легкой симптоматики на 1 сутки ГИ регистрировалось уменьшение вялости, замедленности движений и слабости конечностей в 2,5 раза. Полный регресс неврологических нарушений отмечался к 14 суткам наблюдений посттравматической динамики. Снижалось количество животных с манежными движениями и не регистрировалось появление животных с парезами и параличами (таблицы 43).

Соединение ГИЖ-332 не ослабляло неврологические нарушения, развившиеся вследствие ГИ (таблица 43).

Таблица 43 – Влияние соединений ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на показатели неврологического дефицита (по шкале McGrow) у крыс с ГИ на 1, 7, 14 и 21 сутки

Группа животных	Число крыс в % с нарушениями/число в группе								
	Неврологические показатели:								
	Вялость, замедленность движе-ний	Слабость конечностей	Одно-сторонний п/птоз	Двусторонний п/птоз	Одно-сторонний птоз	Двусторонний птоз	Манеж-ные движения	Парез конечностей 1-4	Паралич конечностей 1-4
на 1 сутки после ГИ									
Контроль ЛО	76 (13/17)	65 (11/17)	0	0	0	0	0	0	0
Контроль ГИ	75 (9/12)	67 (8/12)	17 (2/12)	0	0	0	0	17 (2/12)	0
ГИ + ГИЖ-272	29* (4/14)	43 (6/14)	0	0	0	0	0	14 (2/14)	0
ГИ + ГИЖ-332	30$ (3/10)	20 (2/10)	10 (1/10)	10 (1/10)	0	0	0	20 (2/10)	0
на 7 сутки после ГИ									
Контроль ЛО	0 (0/17)	0	0	0	0	0	0	0	0
Контроль ГИ	33 (3/9)	33 (3/9)	0	0	0	0	11 (1/9)	11 (1/9)	0
ГИ + ГИЖ-272	15 (2/13)	15,4 (2/13)	0	0	0	0	8 (1/13)	0	0
ГИ + ГИЖ-332	25 (2/8)	25 (2/8)	0	0	0	0	13 (1/8)	12,5 (1/8)	0
на 14 сутки после ГИ									
Контроль ЛО	0 (0/17)	0	0	0	0	0	0	0	0
Контроль ГИ	43# (3/7)	43# (3/7)	14(1/7)	0	0	0	14 (1/7)	14 (1/7)	0
ГИ + ГИЖ-272	0* (0/13)	0* (0/13)	0	0	0	0	0	0	0
ГИ + ГИЖ-332	17 (1/6)	33,3 (2/6)	0	0	0	0	17 (1/6)	17 (1/6)	17 (1/6)
на 21 сутки после ГИ									
Контроль ЛО	0 (0/15)	0	0	0	0	0	0	0	0
Контроль ГИ	50# (3/6)	23 (2/6)	0	17 (1/6)	0	0	17 (1/6)	17 (1/6)	0
ГИ + ГИЖ-272	18 (2/11)	18 (2/11)	0	0	0	0	0	0	0
ГИ + ГИЖ-332	20 (1/5)	20 (1/5)	20 (1/5)	20 (1/5)	0	0	40 (2/5)	0	0

Примечание – *p≤0,05 по сравнению с группой контроля с ГИ; # P≤0,05 по сравнению с группой ЛО (точный критерий Фишера).

Таким образом, у крыс с геморрагическим инсультом без терапии на всех периодах (1,7,14, 21 сутки) регистрации постинсультной динамики отмечается развитие легких (слабость конечностей, птозы) и тяжелых неврологический нарушений (манежные движения, парезы и параличи конечностей). Гибель животных к 21 дню наблюдения в контрольной группе с ГИ составила 50%. ГИЖ-272 в дозе 10 мг/кг/7дней снижает выраженность легких и развитие тяжелых неврологических нарушений на 7, 14 и 21 сутки регистрации. Уменьшение выраженности неврологического дефицита под влиянием ГИЖ-272 приводит к увеличению выживаемости крыс на 29%. Соединение ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг/7дней не защищает крыс от гибели и не ослабляет неврологические нарушения, развившиеся вследствие геморрагического инсульта.

Изучение влияния ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на координацию движений после ГИ в тесте «Вращающийся стержень»

Для оценки сенсомоторной координации, силы, выносливости и неврологических моторных нарушений после моделирования ГИ был использован тест вращающегося стержня.

В группе ЛО крыс на 1 сутки после моделирования ГИ наблюдалось, в среднем, 6 падений за 2 минуты теста. При повторном предъявлении теста ЛО животным на 3, 7, 14 и 21 сутки значительно сокращалось количество падений с вращающегося стержня до единичных случаев (таблица 44).

Исследование динамики нарушений координации движений у контрольных крыс с ГИ на 3 сутки после операции показало достоверное увеличение количества падений с вращающегося стержня относительно группы ЛО крыс. На 14 сутки регистрации количество падений с вращающегося стержня не уменьшалось и составляло около 2-3 падений. На 21 сутки регистрации в контрольной группе с ГИ количество падений заметно сокращалось (таблица 44).

У животных, получавших соединение ГИЖ-272, наблюдалась позитивная динамика восстановления мышечной силы и координации движений, начиная с 14 суток после моделирования ГИ и было сопоставимо с показателями группы ЛО животных (таблица 44).

ГИЖ-332 не устранял проявления моторного дефицита у животных с ГИ в тесте «Вращающегося стержня» в течение всего периода регистрации (таблица 44).

Таблица 44 – Изучение способности ГИЖ-272 и ГИЖ-332 снижать неврологический дефицит после ГИ в тесте «Вращающегося стержня»

Группа животных	Доза, мг/кг	Количество падений животных в группе на ротароде в течение 2 минут (максимально 10 падений), вращение с постоянной скоростью– 10 оборотов/мин				
		1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Контроль ЛО	-	10,0 (3,0 - 10,0)	1,0 (0,0 - 2,0)	0,0 (0,0 -1,0)	0,0 (0,0 -1,0)	0,0 (0,0 -0,0)
Контроль ГИ	-	10,0 (8,8 -10,0)	2,0@ (1,0 -4,0)	1,0 (0,0 -2,8)	2,5# (0,0 -4,8)	0,0 (0,0 -1,5)
ГИ+ГИЖ-272	10	10,00 (4,0 -10,0)	0,00 (0,0 -4,0)	0,00 (0,0 -1,0)	0,0* (0,0 -0,0)	0,0 (0,0 -0,5)
ГИ+ГИЖ-332	10	10,0 (10,0 -10,0)	2,0 (0,0 -8,3)	1,0 (0,0 -4,8)	3,0 (0,0 -5,0)	1,00 (0,0 -2,0)

Примечания: *P≤0,05 по сравнению с группой контроляс ГИ; # P≤0,05 и @ P≤0,1 по сравнению с группой ЛО (критерий Краскела-Уоллиса с переходом на множественные сравнения).

Изучение влияния производных оксима дибензофуранона на когнитивный дефицит животных с ГИ в тесте Y-образного лабиринта

Поведение в Y-образном лабиринте крыс с ГИ изучали на 5 - 6 день постинсультной динамики.

Тестирование в Y-образном лабиринте показало нарушение способности к исследованию у крыс с экспериментальным повреждением головного мозга по геморрагическому типу. В группе крыс с ГИ, не получавших терапию, наблюдалось нарушение пространственной памяти в Y-образном лабиринте на 6 сутки после операции, что выражалось в значимом снижении времени нахождения в 2-3 раза в новом, ранее не исследованном при обучении, рукаве «С» по сравнению с животными ЛО группы (таблицы 45). Кроме того наблюдалось снижение количества переходов между рукавами (таблица 46).

Соединение ГИЖ-272 оказывал положительный эффект на когнитивные функции животных, сниженные ГИ, в тесте Y-образного лабиринта. Регистрировалось увеличение длительности исследования «нового» рукав лабиринта в 3 раза относительно контрольной группы крыс с ГИ без терапии. У животных, получавших ГИЖ-272, наблюдалось увеличение количества заходов в рукав «С» и соответствующее увеличение доли нахождения животных в этом рукаве до 25,5% (в контрольной группе - 8,5%) (таблицы 45, 46).

Статистически значимых различий поведения в Y-образном лабиринте между контрольной группой животных с ГИ и группой, получавшей ГИЖ-332, не выявлено (таблицы 45,46).

Таблица 45 – Влияние ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на когнитивные нарушения крыс с ГИ в Y-образном лабиринте (временной показатель) на 6 сутки после операции

Группа животных	Доза, мг/кг	Время в рукавах			Время нахождения в центральном отсеке, с	Доля времени нахождения (%)
		A	B	C		
Контроль ЛО	-	140,3±21,6	55,3±11,3	61,9±9,8	36,6±17,5	26,6±3,3
Контроль ГИ	-	175,5±27,7	46,9±10,5	25,5±7,4#	52,2±16,3	8,5±2,5#
ГИ+ ГИЖ-272	10	118,9±20,1	65,8±10,7	76,5±12,5*	38,9±12,1	25,5±4,2*
ГИ+ ГИЖ-332	10	195,9±35,4	38,8±13,6	49,4±17,9	16,0± 10,1	16,5±5,9

Примечание – *P≤0,05 по сравнению с группой контроля с ГИ; # p≤0,05 по сравнению с группой ЛО (критерий Краскела-Уоллиса с переходом на множественные сравнения).

Таблица 46 – Влияние ГИЖ-272 и ГИЖ-332 на когнитивные нарушения крыс с ГИ в Y-образном лабиринте (количественный показатель) на 6 сутки после операции

Группа животных	Доза, мг/кг	Кол-во заходов в рукава:			Общее число переходов, ед.
		A	B	C	
Контроль ЛО	-	3,75 ± 0,41	2,38 ± 0,32	2,88 ± 0,35	9,00 ± 0,89
Контроль ГИ	-	2,64 ± 0,41	1,73 ± 0,33	1,27 ± 0,30#	5,64 ± 0,93#
ГИ+ГИЖ-272	10	3,38 ± 0,68	2,54 ± 0,62	2,54 ± 0,58*	8,46 ± 1,85
ГИ+ГИЖ-332	10	2,50 ± 0,38	1,25 ± 0,45	1,50 ± 0,53	5,25 ± 1,29

Примечание – *P≤0,05 по сравнению с группой контроля с ГИ; # P≤0,05 по сравнению с группой ЛО (критерий Краскела-Уоллиса с переходом на множественные сравнения).

Таким образом, защитным эффектом на модели интрацеребральной посттравматической гематомы, геморрагического инсульта, обладает соединение ГИЖ-272, которое способствует выживанию животных и ослаблению неврологического и моторного дефицитов. ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней) устраняет когнитивные нарушения животных с ГИ, выявленные на 6 день моделирования патологии в условиях Y-образного лабиринта, увеличивая мотивацию животных к исследованию нового рукава лабиринта «С». Соединение ГИЖ-332 (10 мг/кг/7 дней) не проявляет защитного эффекта в отношении гибели и последствий ГИ.

Заключение

Установлено, что соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней) обладает нейропротективным эффектом на модели церебральных повреждений мозга по ишемическому (глобальная ишемия) и геморрагическому типу (посттравматическая гематома). ГИЖ-272 защищает животных от гибели и уменьшает выраженность неврологического и когнитивного дефицитов, вызывает

увеличение количества выживших нейронов в коре больших полушарий и в гиппокампе (особенно в зубчатой извилине гиппокампа) и предотвращает дезорганизацию нейрональных слоев коры больших полушарий. Установлены цереброваскулярные свойства ГИЖ-272 (60 мг/кг/ в/в) при его однократном введении. Соединение ГИЖ-332 (10 мг/кг/7 дней) и леветирацетам (100 мг/кг/7 дней) не обладают противоишемическим эффектом в модели глобальной ишемии. ГИЖ-332 (10 мг/кг/7 дней) не защищает животных от гибели и развития неврологических и когнитивных нарушений в модели посттравматической гематомы.

Полученные результаты являются основой для дальнейшей разработки ГИЖ-272, соединения с противосудорожной и противоишемической активностью, в качестве средства лечения эпилепсий и постинсультных эпилепсий.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:

*Литвинова, С. А. Нейропротективные свойства производного фурана–соединения ГИЖ-276 на модели геморрагического инсульта [Текст] / **С. А. Литвинова**, Н. Н. Золотов, Т. А. Воронина, И. С. Кутепова, Л.А. Жмуренко // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – №. 3. – С.31-33 [57].*

*Кутепова И. С. Исследование порога судорожных проявлений у животных после перенесенного инсульта [Текст] / И. С. Кутепова, **С.А. Литвинова**, Т.А. Воронина // Сборник тезисов Сеченовского Международного Биомедицинского Саммита. – 2017. – С.73.[48].*

*Кутепова И. С. Исследование влияния соединений с противосудорожной активностью на судорожный порог у животных после перенесенного инсульта [Текст] / И. С. Кутепова, **С.А. Литвинова**, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – 2018. – Т. 81, №. 5s. – С. 138 [50].*

*Кутепова И.С. Исследование влияния производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на выживаемость и энцефалографические показатели мозга крыс с ишемическим инсультом [Текст] / И.С. Кутепова, **С.А. Литвинова,** Л.Н. Неробкова, Т.А. Воронина // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки». - 2018. – С. 67-69 [51].*

*Литвинова, С. А. Противоишемические и цереброваскулярные свойства производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 [Текст] / **С.А. Литвинова**, И.С. Кутепова, Е.В. Курза, М.Д. Кондратова, Т.А. Воронина, Т.С. Ганьшина, Р.С. Мирзоян, Л.А. Жмуренко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 6. – С. 3-7 [62].*

*Воронина Т.А. Возможности фармакологической коррекции нарушений, возникающих при ишемии мозга и пароксизмальных состояниях. Производные дибензофурана [Текст] / Воронина Т.А., **Литвинова С.А.** // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии – 2019. –Т. 17. -№1. С 65-70 [10].*

*Жмуренко Л.А. Синтез, противосудорожная, антигипоксическая и противоишемическая активность производных оксима дибензофуранона [Текст] / Жмуренко Л.А., **Литвинова С.А**., Кутепова И.С., Неробкова Л.Н., Мокров Г.В., Ребеко А.Г., Воронина Т.А., Гудашева Т.А // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 11. – С. 9-16 [31].*

*Кутепова, И. С. Исследование нового производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на моделях очаговой эпилепсии и интрацеребральной посттравматической гематомы [Текст] / Кутепова, И. С., **Литвинова, С. А.,** Воронина, Т. А., Жмуренко, Л. А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. - 83(9), 3-8 [54].*

Глава 8 Особенности пароксизмальной активности и спектральной мощности ЭЭГ после глобальной ишемии мозга и изучение эффектов соединения ГИЖ-272 и леветирацетама.

После инсульта в областях повреждения нейронные сети претерпевают анатомические и физиологические изменения, что предрасполагает их к синхронизации и вызывает появление постишемической судорожной активности [102, 223]. Целью данного раздела исследования было изучить особенности пароксизмальной активности и изменения спектральной мощности ЭЭГ в постишемический период у крыс, перенесших глобальную ишемию мозга, и изучить эффекты ГИЖ-272, соединения сочетающего противосудорожную и нейропротективную активности, и леветирацетама на эти изменения.

8.1 Исследование пароксизмальной активности и спектральных изменений ЭЭГ мозга крыс на разных сроках постишемического периода и влияние ГИЖ-272 и леветирацетама на эти изменения

В эксперименте использовали крыс самцов, массой 220-250 г. В качестве модели ишемического повреждения мозга использовали глобальную ишемию (модель ишемического инсульта, ИИ), протокол создания которой изложен в разделе «Материалы и методы». После вживления долгосрочных электродов делали фоновую запись ЭЭГ (до ишемии). Регистрацию биоэлектрической активности мозга после ишемии проводили на 1, 2, 7, 14 и 28 сутки после операции. ГИЖ-272 (10 мг/кг, в/б) и леветирацетам (100 мг/кг, в/б) вводили в течение 7 дней.

Изучение влияния ГИЖ-272 и леветирацетама на пароксизмальную активность в постишемический период.

Исследование влияния ишемического повреждения на изменения биоэлектрической активности мозга крыс показало, что на 1 сутки после моделирования патологии наблюдалось уплощение ЭЭГ (снижение амплитуды всех волн) и отсутствие заметной пароксизмальной активности (рисунок 35). Появление синхронных острых пиков и пик-волновых разрядов наблюдалось со 2 суток после ишемии и регистрировалось в ранний (на 2-7 сутки) и поздний (на 28 сутки) постишемические периоды. В этих временных точках ишемии выявлено статистически достоверное увеличение числа и длительности разрядов относительно фоновых значений (рисунок 36).

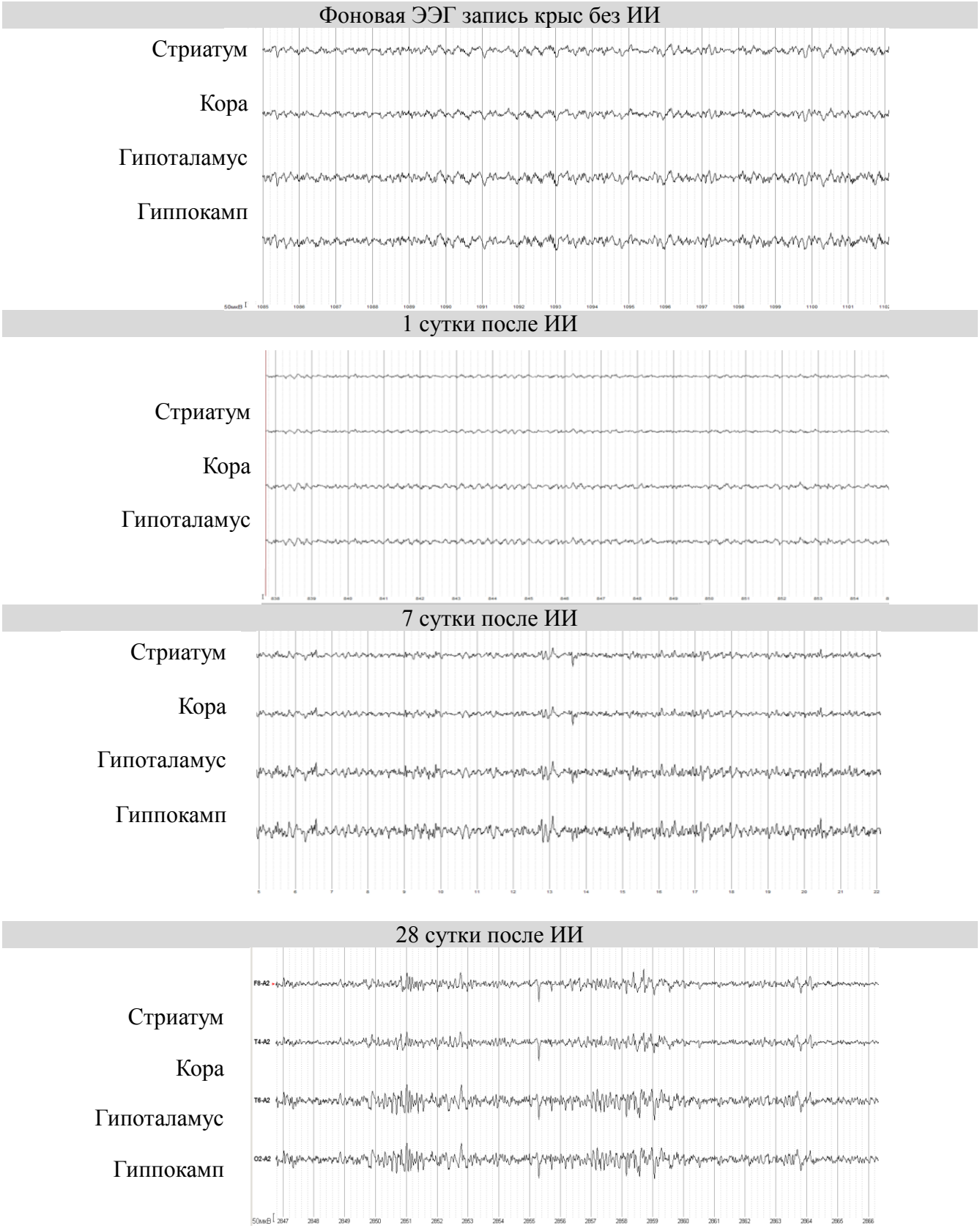
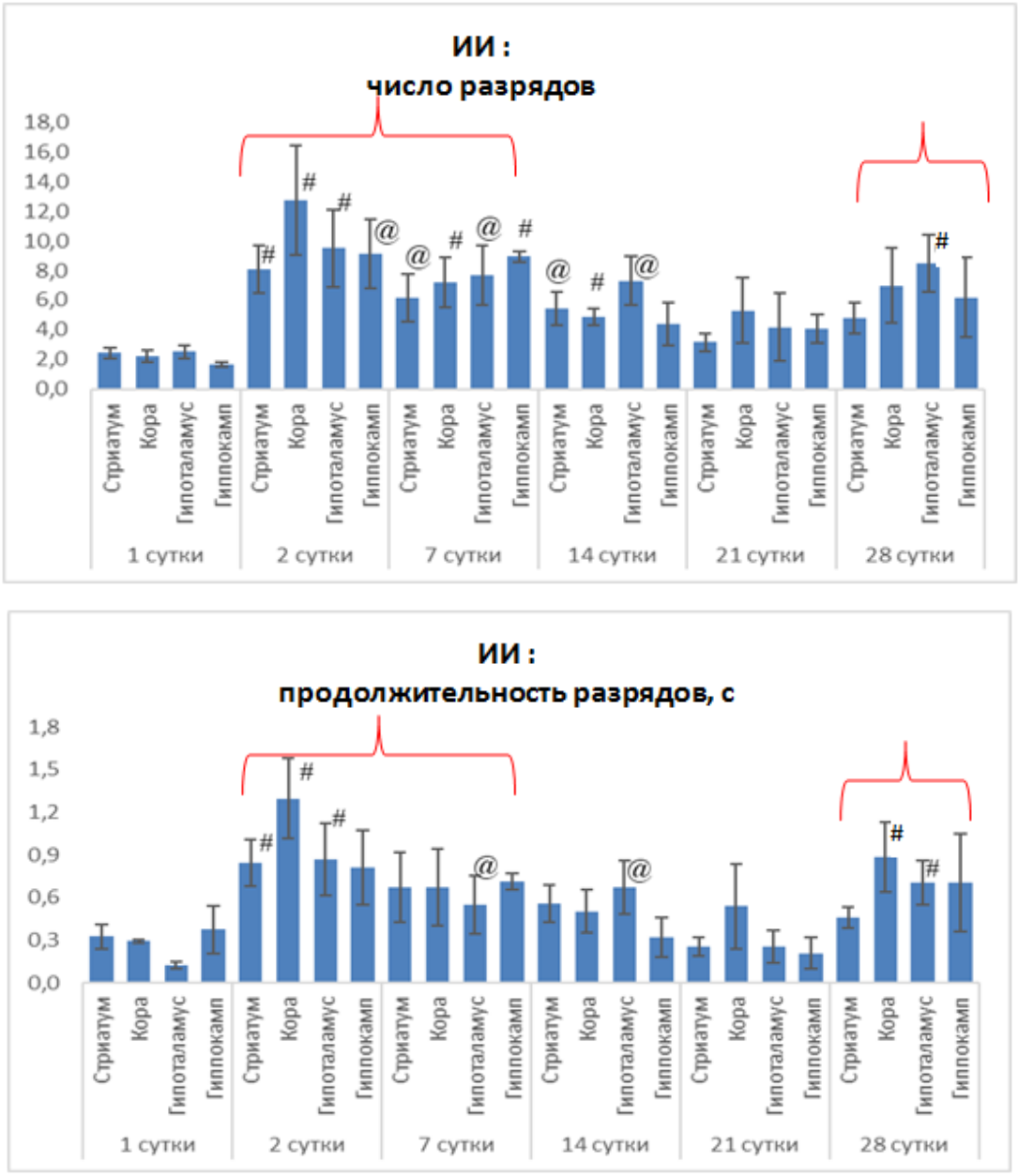


Рисунок 35 – Изменения биоэлектрической активности мозга крыс контрольной группы до (фон) и после ишемии на 1, 7 и 28 сутки (запись ЭЭГ)

Пароксизмальная активность, регистрируемая в ранний период ишемии (со 2 до 7 суток), наблюдалась в стриатуме, коре и гипоталамусе, выраженность которой (число разрядов и их продолжительность) была максимальной в коре. На 14 и 21 сутки после ишемии пароксизмальная активность значительно снижалась и не отличалась от значений 1-х суток. На 28 сутки ишемии пароксизмальная активность вновь увеличивалась относительно 1-х суток и достигла статистической достоверности в гипоталамусе (по числу разрядов и их продолжительности) и коре (по продолжительности разрядов) (рисунок 36).



Примечание – достоверность отличий по сравнению с 1 сутками ишемии, при # P≤0,05 и @ P≤0,1 (парный критерий Стьюдента).

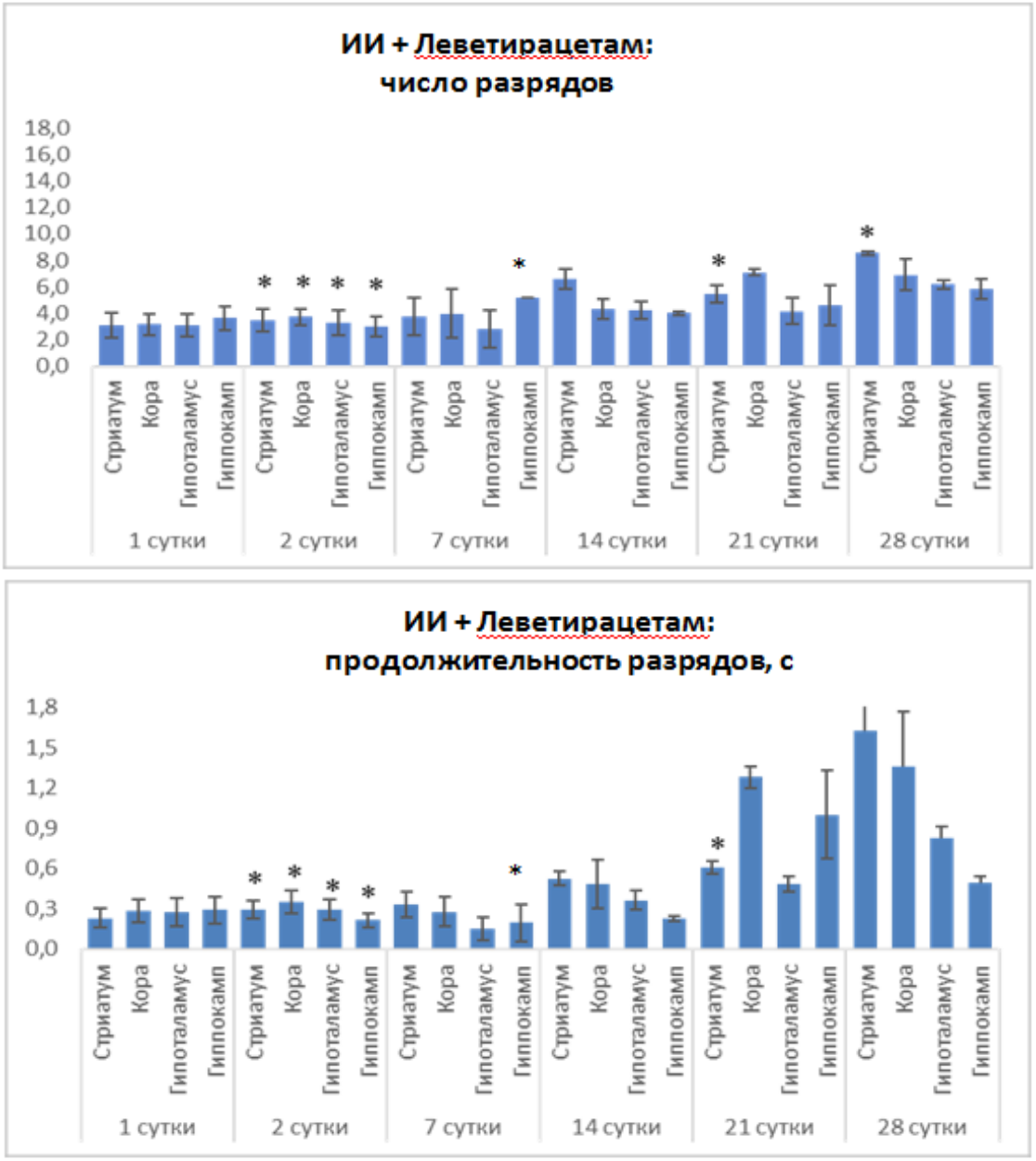
Рисунок 36 – Динамика появления пароксизмальной активности у крыс с глобальной ишемией (ИИ)

Соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг) при 7-дневном введении подавляло раннюю пароксизмальную активность (на 2-7 сутки) после ишемии во всех исследуемых структурах мозга. Наблюдалось снижение среднего числа и длительности разрядов с преимущественным влиянием на гипоталамус и гиппокамп. На 14 сутки ишемии ГИЖ-272 статистически достоверно уменьшал число разрядов в гипоталамусе относительно контрольных значений, но не влиял на появление поздней пароксизмальной активности на 28 сутки регистрации (рисунки 37, 39).

Примечание – достоверность отличий по сравнению с соответствующими сутками контрольной группы с ИИ, при * $P \leq 0,05$ и \$ $P \leq 0,1$ (критерий Краскела -Уоллиса).

Рисунок 37 – Влияние ГИЖ-272 на постишемическую пароксизмальную активность у крыс с глобальной ишемией мозга

Леветирацетам (100 мг/кг) при 7-дневном введении уменьшал число разрядов и их длительность на 2 сутки ИИ во всех исследуемых структурах мозга, а на 7 сутки только в гиппокампе. Леветирацетам не снижал пароксизмальную активность на 14, 21 и 28 сутки ишемии. Кроме того в стриатуме под влиянием леветирацетама наблюдалось увеличение числа разрядов на 21 и 28 сутки ишемии (рисунки 38, 39).



Примечание – достоверность отличий по сравнению с соответствующими сутками контрольной группы с ИИ, при * P≤0,05 и $ P≤0,1 (критерий Краскела -Уоллиса).

Рисунок 38 – Влияние леветирацетама на постишемическую пароксизмальную активность у крыс с глобальной ишемией мозга

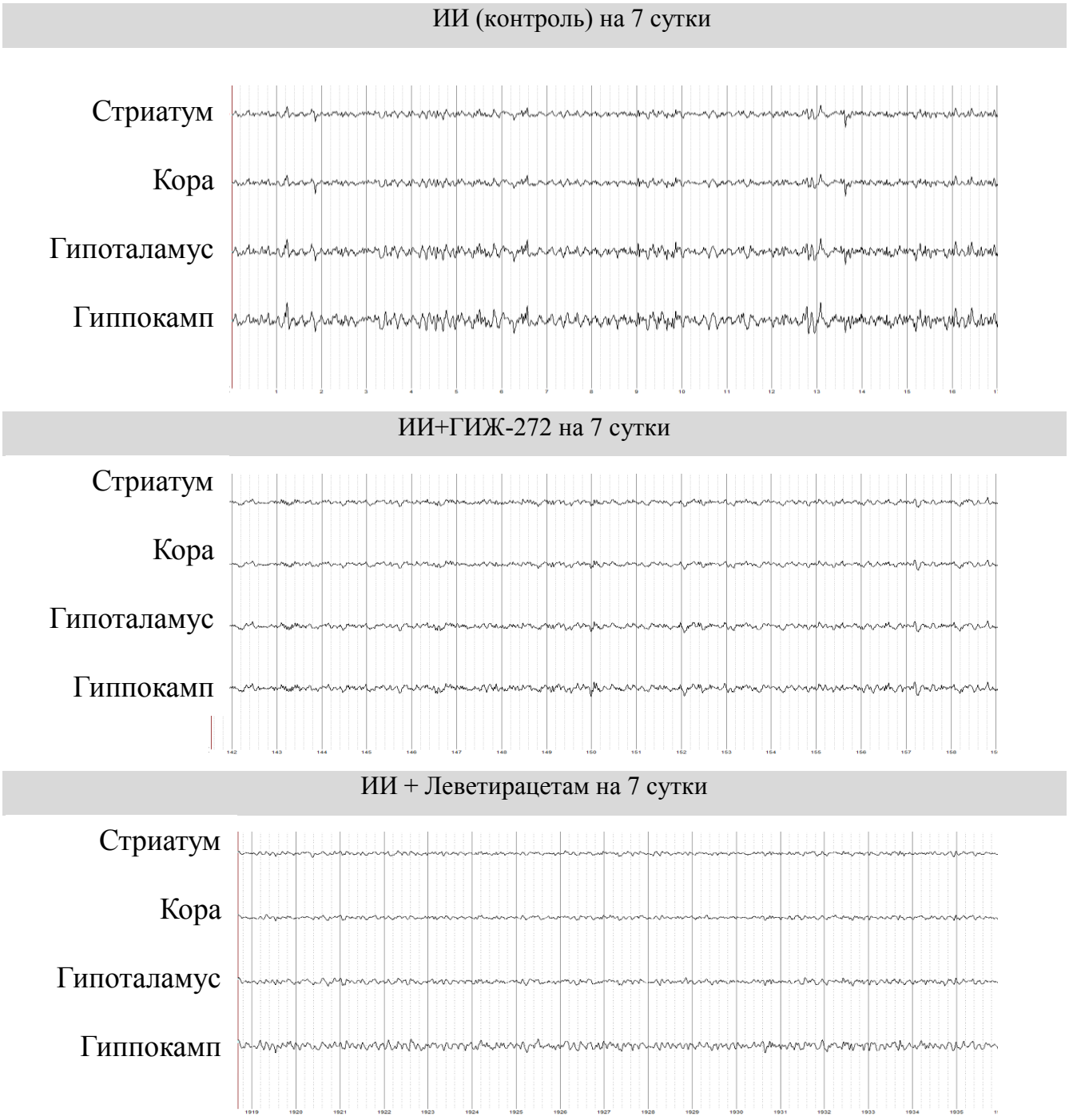


Рисунок 39 – Запись ЭЭГ крыс на 7 сутки ишемии (ИИ), получивших ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) и леветирацетам (100 мг/кг/7дней)

Таким образом, на модели глобальной ишемии мозга установлено появление пароксизмальной активности как в ранние (2-7 сутки), так и в поздние (с 28-х суток) периоды ишемии. Лидирующей структурой по числу пароксизмальных разрядов на ранних сроках ишемии является кора, а на поздних - гипоталамус. ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) снижал раннюю пароксизмальную активность во всех исследуемых структурах мозга (стриатум, кора, гипоталамус, гиппокамп) на 2 и 7 сутки ИИ. Препарат сравнения леветирацетам (100

мг/кг/7дней) также подавлял число и длительность пароксизмов во всех исследуемых структурах на 2 сутки ИИ, тогда как на 7 сутки ИИ эффект сохранялся только в гиппокампе. ГИЖ-272 не влиял на позднюю пароксизмальную активность, появляющуюся на 28 сутки ИИ, что может быть обусловлено недостаточной длительностью их введения. Леветирацетам не подавлял число и длительность разрядов в поздний период ишемии, при этом наблюдалось увеличение числа разрядов в стриатуме на 21 и 28 сутки ИИ.

8.2 Изучение влияния ГИЖ-272 и леветирацетама на изменения спектра мощности ЭЭГ

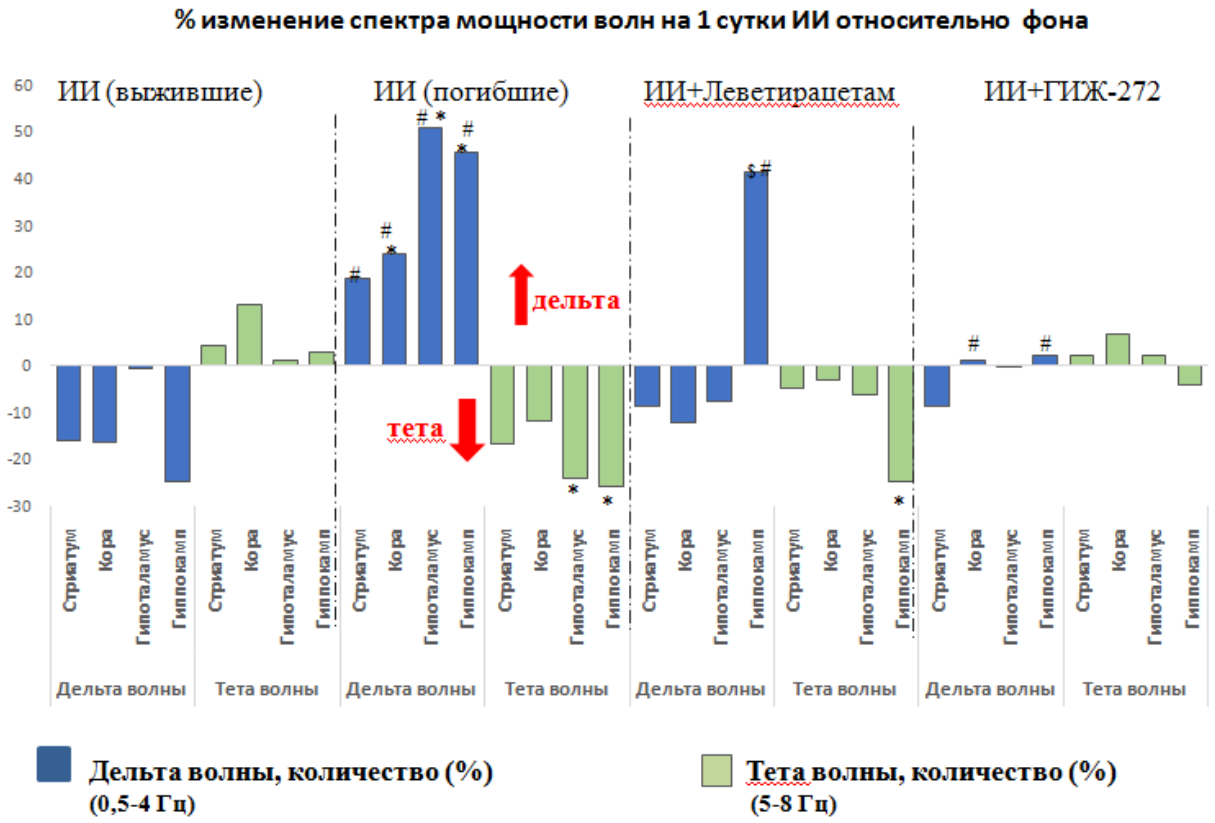
Изучение влияния ГИЖ-272 и леветирацетама на изменения мощности спектра ЭЭГ в 1 сутки ишемии.

Изменения спектральных характеристик ЭЭГ крыс на 1 сутки ишемии вычисляли при сравнении с фоновыми показателями (до ишемии).

Спектральный анализ биоэлектрической активности мозга контрольной группы крыс, проведенный на 1 сутки ИИ выявил увеличение мощности спектра в диапазоне дельта-активности, особенно выраженное в гипоталамусе и гиппокампе (45 - 50%). У животных наблюдалось увеличение количества дельта волн (1-4 Гц) во всех исследуемых структурах мозга и снижение тета-активности (5-8 Гц), что свидетельствует о замедлении ритмов мозга. Все животные, с выявленным замедлением ритма мозга на 1 сутки ИИ, погибали в дальнейшем в промежутке 2 - 10 сутки. Животные контрольной группы, у которых не наблюдалось увеличение дельта волн относительно фоновых значений и не регистрировались изменения мощности тета - волн, впоследствии выживали (рисунок 40).

При исследовании биоэлектрической активности мозга животных на 1 сутки ИИ, получивших ГИЖ-272 (10 мг/кг) дважды (через 2,5 часа после моделирование патологии и за 2 часа до начала записи ЭЭГ), наблюдалось подавление роста дельта-активности и предотвращение снижения тета-активности при сравнении с крысами контрольной группы с ИИ, которые впоследствии погибли. Спектральные ЭЭГ характеристики животных в данной группе восстанавливались до фоновых значений (до ишемии) и регистрировались на уровне показателей выживших крыс, что свидетельствует о защитном действии ГИЖ-272 (рисунок 40).

Леветирацетам 100 мг/кг при аналогичном режиме введения снижал представленность (%) дельта активности и препятствовал снижению тета-активности во всех исследуемых структурах мозга кроме гиппокампа (рисунок 40).



Примечание – достоверность отличий по сравнению с фоновыми значениями (до ИИ, принятые за 100%), при * P≤0,05 и $ P≤0,1 (парный критерий Стьюдента); # - достоверность значений по сравнению с группой контроля с ИИ (выжившие), при P≤0,05 (Краскела-Уоллиса с переходом на множественные сравнения).

Рисунок 40 – Изменение спектральной мощности на 1-е сутки ИИ относительно фоновых значений до ишемии (%)

Таким образом, спектральный анализ ЭЭГ крыс контрольной группы после моделирования ишемии показал значительное изменения дельта-активности на 1 сутки ишемии. Наблюдалось замедление ритмов мозга, что регистрировалось по увеличению представленности (%) дельта волн (1-4 Гц) с наибольшей выраженностью в гипоталамусе и гиппокампе и снижению тета-активности (4-8 Гц) во всех исследуемых структурах относительно фоновых значений с наибольшей выраженностью в гиппокампе. Животные с выявленным замедлением ритма мозга на 1 сутки ИИ не выживали и погибали в период 2 - 10 сутки. Контрольные крысы, у которых наблюдается снижение дельта волн относительно фоновых значений в этот период и не регистрируются изменения мощности тета волн, выживали. ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) препятствовал повышению дельта активности в 1 сутки ИИ и снижению тета волн во всех структурах мозга. Леветирацетам (100 мг/кг/7 дней) устранял изменения % представленности дельта- и тета волн, характерные для погибающих крыс, в стриатуме, коре, гипоталамусе, но не в гиппокампе.

Изучение влияния ГИЖ-272 и леветирацетама на динамику постишемических изменений мощности спектра ЭЭГ мозга на 2 - 28 сутки ишемии.

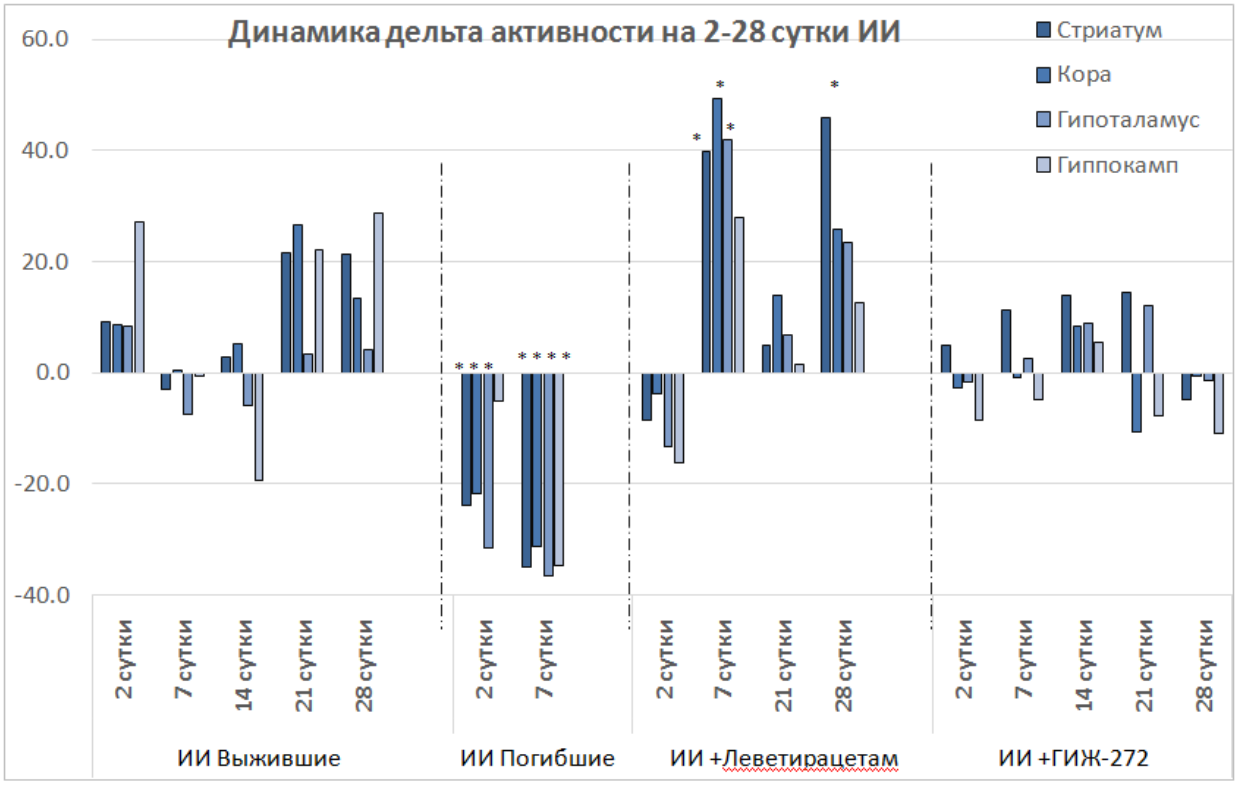
ЭЭГ-обследование позволяет выявить межприступные нарушения биоэлектрической активности головного мозга у 80-90% больных эпилепсией. Спектральный анализ межприступных отрезков ЭЭГ (без пароксизмальных паттернов) проводили на 2, 7, 14, 21 и 28 сутки ишемии при сравнении с данными спектральных характеристик с 1 сутками ишемии.

Установлено, что у животных контрольной группы с ИИ (которые впоследствии погибли к 10 суткам) со 2-х суток ишемии наблюдалось прогрессирующее снижение дельта-активности относительно 1-х суток во всех исследованных структурах мозга с максимальными значениями в гипоталамусе (-37%). У данной части контрольных животных с ИИ на 7 сутки регистрировалось еще более выраженное снижение дельта-активности от всего диапазона частот (1-4 Гц) (рисунок 41, таблица 46).

У выживших контрольных животных с ИИ не наблюдалось снижения дельта волн (1-4 Гц) на 2 и 7 сутки после операции, а на 21-28 сутки ИИ отмечался их рост (рисунок 35, таблица 46).

ГИЖ-272 (10 мг/кг/ 7 дней) способствовал сохранению спектральных характеристик дельта активности (1-4 Гц) в постишемический период со 2 по 28 сутки, что регистрировалось по отсутствию падения дельта активности относительно 1-х суток ишемии (рисунок 35, таблица 46).

Препарат сравнения леветирацетам (10 мг/кг/ однократно/7 дней) препятствовал снижению дельта волн на 2 сутки после ИИ и значительно увеличивал их мощность в коре и гипоталамусе на 7 сутки и в стриатуме на 7 и 28 сутки ИИ (рисунок 41, таблица 46).



Примечание – * - достоверность значений изменений по сравнению с данными 1-х суток ИИ, принятых за 100%, при P≤0,05 (парный критерий Стьюдента).

Рисунок 41 – Изменение спектральной мощности дельта-активности (1-4 Гц) в постишемический период относительно 1-х суток ишемии (%)

В таблице 47 представлены данные изменения процентной мощности дельта активности с шагом 1 Гц. Результаты представлены в относительных показателях при сравнении с 1 сутками ИИ, которые принимали за 100%.

Установлено, что выживание животных после ИИ сопровождалось статистически достоверным увеличением количества (%) дельта волн за счет частот 3 Гц и 4 Гц в коре (до 39%), в стриатуме (до 40%) и в гиппокампе (до 46%). Гибель животных в группе контрольных крыс с ИИ сопровождалась снижением частоты 4 Гц во всех структурах мозга ($_{(-)}$47% – $_{(-)}$54%), а частоты 1 Гц ($_{(-)}$37% – $_{(-)}$39%) в гипоталамусе и гиппокампе (таблица 47).

ГИЖ-272 препятствовал снижению 4 Гц на 2 сутки ИИ в стриатуме и гиппокампе, а на 7 сутки ИИ во всех структурах мозга, а также увеличивал частоту 3 Гц в стриатуме и гипоталамусе (таблица 47).

Леветирацетам препятствовал снижению частоты 4 Гц на 2 и 7 сутки после ИИ, значительно увеличивал 3 Гц в стриатуме и коре на 7 сутки ИИ и 1-2 Гц на 28 сутки ИИ во всех структурах мозга (таблица 47).

Таблица 47 – Изменение процентной мощности дельта активности (1-4 Гц) в разных структурах мозга контрольных крыс в постишемический период и крыс, получавших ГИЖ-272 и леветирацетам относительно 1 суток ишемии

		Стриатум				Кора				Гипоталамус				Гиппокамп			
		1 Hz	2 Hz	3 Hz	4 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz	4 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz	4 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz	4 Hz
Контроль выжившие	2 сутки	-1	20	-1	14	9	16	1	10	-5	-3	9	19	56	56	27	9
	7 сутки	-17	-5	-1	-2	-17	-4	4	2	-18	-19	-6	2	-28	-2	0	2
	14 сутки	-45	-9	10	12	-40	-11	13 &	16	-40	-19	-2	7	-68	-31	-14	-14
	21 сутки	-29	5	36 &	27 &	-13	12	39 &	30 &	-30	-11	15	9	-33	33	37	8
	28 сутки	-43	-6	40 &	33 &	-59	-17	29 &	31 &	-40	-20	19	15	1	29	46 &	16
Контроль погибшие	2 сутки	-16	-25	-19	-48 &	44	13	-6	-47 &	-14	-10	-17	-51 &	142 &	63	22	-50 &
	7 сутки	-28	-18	-24	-50 &	-24	-5	-17	-50 &	-39 &	-23 &	-23 &	-51 &	-37 &	-12	-15	-54 &
Леветирацетам	2 сутки	4	-12	4	-17	20	2	6	-16	17	1	6	-19	2	-12	-6	-27
	7 сутки	20	28	89 &	9	174	61 &	84 &	10	70	53	108	-14	30	24	72	-3
	14 сутки	50	30	6	-15	109	49	47	-8	83	39	50	-19	44	29	27	-18
	21 сутки	82	32	10	-19	102	44	24	-14	97	38	18	-22	56	32	10	-21
	28 сутки	330 &	85 &	64 &	-7	239 &	68 &	36	-15	181 &	68 &	37	-18	151 &	51 &	24	-19
ГИЖ-272	2 сутки	25	-2	37	-18	22	0	30	-31 &	13	3	24	-27 &	21	-8	24	-34
	7 сутки	20	-5	48	-7	8	-8	36	-25	-1	-3	33	-18	3	-12	36	-30
	14 сутки	8	-7	58	-7	24	-1	50	-18	6	2	45	-15	18	-1	57	-29
	21 сутки	47	-8	50 &	1	5	-32	15	-16	162	10	38 &	-14	11	-26	28	-23
	28 сутки	30	-21	21	-15	92	3	23	-26	67	5	20	-26 &	62	-9	21	-37 &

Примечания: представленные цифры относительные (%), процент изменения дельта активности с шагом 1 Гц при сравнении с 1-и сутками ИИ; & - достоверность значений по сравнению с 1-и сутками ИИ, при $P \leq 0,05$ (дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой по Даннету).

Спектральный анализ тета - активности (% мощность) в динамике течения ИИ показал, что наибольшие изменения после ишемии наблюдались в диапазоне 6 и 7 Гц.

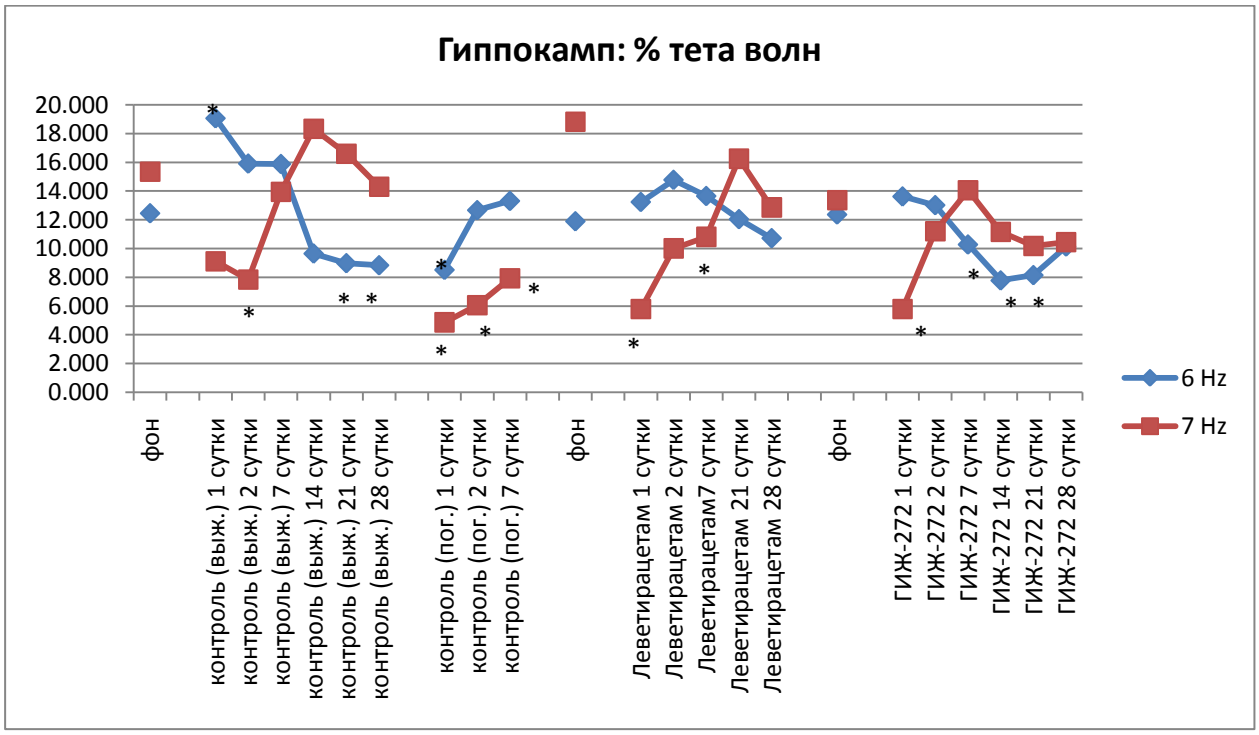
У животных контрольной группы, которые впоследствии погибали (к 10 суткам ИИ) установлено, что на 1 сутки ИИ отмечались низкие значения частоты 7 Гц во всех структурах мозга (кора, стриатум, гипоталамус, гиппокамп). На 2-7 сутки ИИ наблюдалось

прогрессирующее повышение % мощности 6 Гц, при этом представленность частоты 7 Гц оставалась на низком уровне относительно фона (до ишемии) (рисунки 42-45).

Контрольные крысы, которые пережили ишемию, демонстрировали высокий % частоты 6 Гц на 1 сутки ИИ, которая впоследствии снижалась к 7 суткам и была сопоставима с фоном, а к 21-28 дню – была ниже фоновых значений во всех структурах мозга. Значения частоты 7 Гц у выживших контрольных животных на 1-7 сутки ИИ были выше, чем у крыс, которые погибали. Впоследствии к 14 суткам ИИ % частоты 7 Гц повышался до фоновых значений (рисунки 42-45).

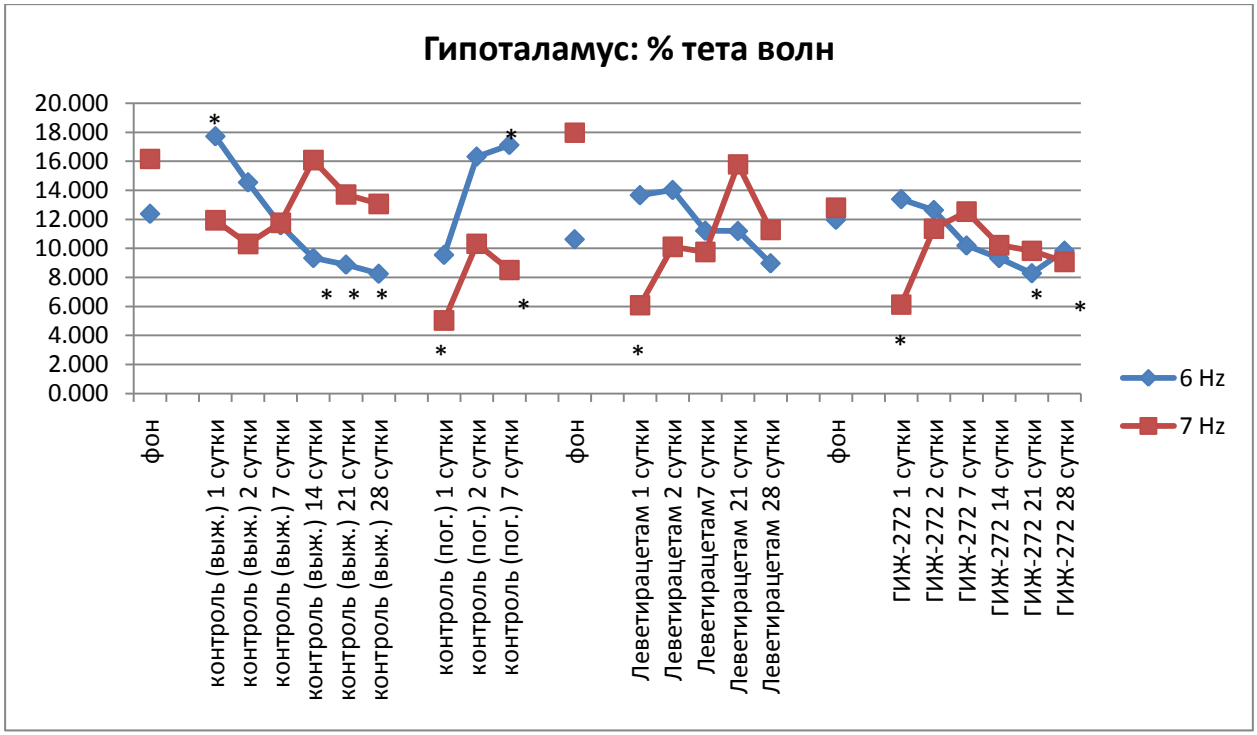
В группе крыс, получавших ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней), наблюдалось восстановление представленности частоты 7 Гц до фоновых значений уже на 2 день ИИ. Частота 6 Гц на 1 сутки ИИ не превышала фоновые значения и, как и у выживших контрольных крыс, была ниже уровня фона в поздний период ишемии (на 21-28 день) в гипоталамусе и гиппокампе (рисунки 42-45).

Леветирацетам (100 мг/кг/7 дней) способствовал восстановлению % мощности частоты 7 Гц на 21-28 сутки ишемии, однако эта частота оставалась ниже фоновых значений. Частота 6 Гц не изменялась относительно фоновых значений (рисунки 42-45).



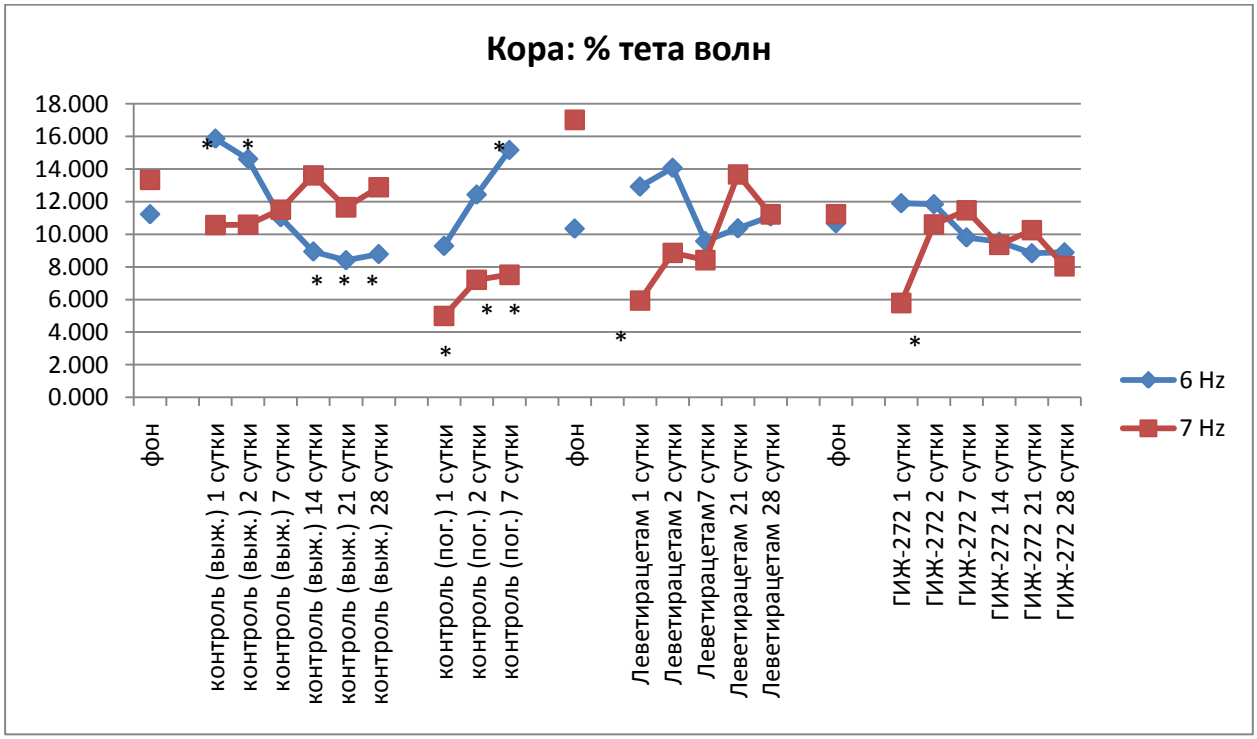
Примечание – * P≤0,05 по сравнению с фоном (парный критерий Стьюдента); контроль (выж) – выжившие, контроль (пог) - погибшие.

Рисунок 42 – Изменение спектральной мощности тета-активности (6 и 7 Гц) в постишемический период относительно 1-х суток ишемии (%) в гиппокампе



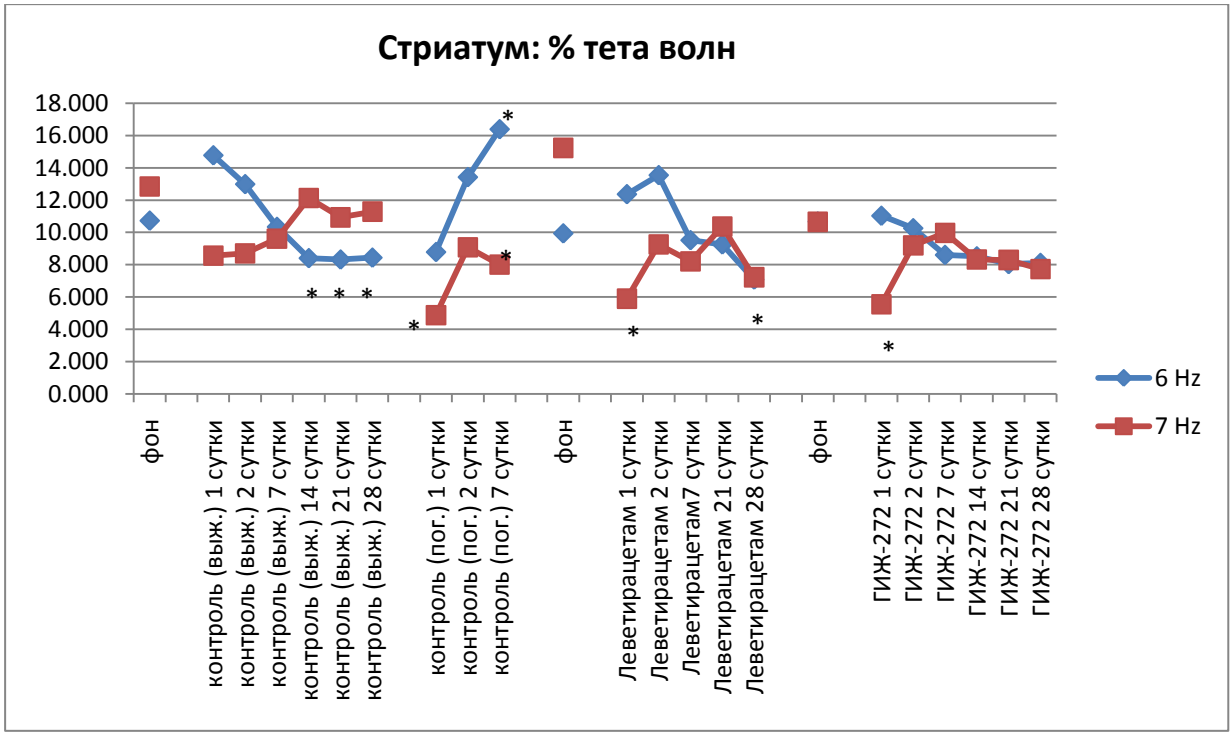
Примечание – * P≤0,05 по сравнению с фоном (парный критерий Стьюдента); контроль (выж) – выжившие, контроль (пог) - погибшие.

Рисунок 43– Изменение спектральной мощности тета-активности (6 и 7 Гц) в постишемический период относительно 1-х суток ишемии (%) в гипоталамусе



Примечание – * P≤0,05 по сравнению с фоном (парный критерий Стьюдента); контроль (выж) – выжившие, контроль (пог) - погибшие.

Рисунок 44– Изменение спектральной мощности тета-активности (6 и 7 Гц) в постишемический период относительно 1-х суток ишемии (%) в коре



Примечание – * P≤0,05 по сравнению с фоном (парный критерий Стьюдента); контроль (выж) – выжившие, контроль (пог) – погибшие.

Рисунок 45 – Изменение спектральной мощности тета-активности (4-8 Гц) в постишемический период относительно 1-х суток ишемии (%) в стриатуме

Таким образом, со 2-х суток ИИ у контрольных крыс, не переживших ишемию, наблюдалось прогрессирующее снижение дельта- и тета- активности. У выживших контрольных крыс дельта- и тета-активность в ранний постишемический период не снижалась, а в поздний период (21 и 28 сутки ИИ) дельта ритмы усиливались. Под влиянием ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) у животных с ИИ в постишемический период не наблюдается изменений суммарной дельта- (1-4 Гц) и тета- (5-8 Гц) активностей относительно 1 суток ишемии и фоновых значений до ишемии. При этом ко 2 суткам ИИ восстанавливается частота 7 Гц, сниженная у контрольных животных, которые погибали. Леветирацетам (100 мг/кг/7дней) статистически достоверно вызывает увеличение дельта активности на 7 и 28 сутки регистрации ИИ, однако частота 7 Гц восстанавливалась только к 21 суткам ИИ.

Заключение

Таким образом, ишемическое повреждение мозга, вызванное двусторонней перевязкой сонных артерий, вызывает появление ранней (2-7 сутки ИИ) и поздней (с 28 суток ИИ) пароксизмальной активности в постишемический период. Время появления пароксизмальной активности в постишемический период у крыс совпадает с клиническими данными и делит ее

на раннюю, которая наблюдается со 2-го дня ишемии и регистрируется первые 7 дней, и позднюю пароксизмальную активность [21, 102, 223].

ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) снижает раннюю пароксизмальную активность на 2 и 7 сутки ИИ во всех исследуемых структурах мозга (стриатум, кора, гипоталамус, гиппокамп), не влияя на число и длительность разрядов на 28 сутки регистрации. Препарат сравнения леветирацетам (100 мг/кг/7дней) на 2 сутки ИИ подавляет число и длительность разрядов во всех исследуемых структурах. На 7 сутки ИИ эффект леветирацетама сохраняется только в гиппокампе и не проявляется на 28 сутки ишемии, при этом наблюдается рост пароксизмов в стриатуме в поздний период ишемии.

Дельта волны при ишемическом повреждении является очень чувствительным показателем нейрональной дисфункции и связаны как с объемом поражения, так и с нейрональной пластичностью [90]. В первые дни ишемии дельта активность является маркером низкого кровотока и отека мозга [162, 213], а в поздний период при инсульте скорее признаком перестройки нейронов, сопровождающей фазу восстановления, а также является неинвазивным и легко регистрируемым коррелятом нейронной пластичности [91, 124].

Спектральный анализ ЭЭГ крыс контрольной группы после ишемии показал значительное изменения дельта-активности. Через 24 часа после моделирования патологии у контрольных крыс, которые впоследствии погибли, наблюдается замедление ритмов мозга, что регистрировалось по увеличению представленности дельта волн (1-4 Гц) и снижению тета-активности (4-8 Гц) во всех исследуемых структурах относительно фоновых значений. Далее, у этих животных со 2-х суток ИИ наблюдается прогрессирующее снижение дельта-активности. Как правило, такие животные погибали в течение 10 дней. У выживших контрольных крыс дельта-активность на 1 сутки ИИ была ниже фоновых значений и тета-ритмы оставались без изменений, однако, в последующем, с 21 суток ишемии, количество дельта волн увеличивалось. ГИЖ-272 способствует нормализации дельта- и тета - волн во всех исследованных структурах мозга в 1 сутки ишемии и в последующие дни регистрации постишемического периода. Леветирацетам на 1 сутки ИИ снижает дельта активность во всех структурах мозга кроме гиппокампа и увеличивает ее на 7 и 28 дни ишемии, однако, в меньшей степени, чем ГИЖ-272, способствует восстановлению тета-ритмов.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:

Кутепова И.С. Исследование влияния производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на выживаемость и энцефалографические показатели мозга крыс с ишемическим инсультом [Текст] / И.С. Кутепова, ***С.А. Литвинова,*** *Л.Н. Неробкова, Т.А. Воронина // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки». - 2018. – С. 67-69 [51].*

Litvinova S.A. Effect of ischemic brain damage on bioelectric activity in model of global ischemia in rats [Текст] / S. ***A Litvinova****., I. S. Kutepova // 5th Annual Conference on Stroke and Neurological Disorders. – 2018 [245].*

Kutepova I. Levetiracetam effect on bioelectric activity in model of global ischemia in rats [Текст] / I. S. Kutepova, A. Petrunina, ***S. A. Litvinova*** *// World Brain Congress. – 2019 [233].*

Литвинова, С. А. Противоишемические и цереброваскулярные свойства производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 [Текст] / С.А. Литвинова, И.С. Кутепова, Е.В. Курза, М.Д. Кондратова, Т.А. Воронина, Т.С. Ганьшина, Р.С. Мирзоян, Л.А. Жмуренко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 6. – С. 3-7 [62].

Воронина Т.А. Возможности фармакологической коррекции нарушений, возникающих при ишемии мозга и пароксизмальных состояниях. Производные дибензофурана [Текст] / Воронина Т.А., ***Литвинова С.А.*** *// Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии – 2019. –Т. 17. -№1. С 65-70 [10].*

Litvinova S. A. Levetiracetam effect on behavioral and electrophysiological parameters in rat model of global brain ischemia [Текст] / ***Litvinova S. A****., Kutepova, I. S., Voronina, T. A., & Petrunina, A. A. // Epilepsy Research. – 2020. – Т. 167. – С. 106466 [247].*

Глава 9 Исследование компонентов механизма реализации противосудорожной активности соединений лидеров ГИЖ- 298, ГИЖ-272, ГИЖ-332 и ГИЖ-290

Целью исследования было выявление нейрохимических и нейрорецепторных механизмов реализации противосудорожного действия соединений ГИЖ- 298, ГИЖ 272, ГИЖ-332 и ГИЖ-290.

9.1 Исследование нейрорецептороного механизма противосудорожного действия ГИЖ-298

Поиск возможных мишеней регуляции активности нейронального возбуждения в условиях патологической активации нейронов, вызванной условиями модели судорог, может способствовать лучшему пониманию патогенеза эпилепсии и служить предпосылками к созданию противосудорожных препаратов. Цель исследования изучить участие глутаматных (NMDA mGluII подтипы), дофаминовых (D2) и серотониновых (5-HT2A) рецепторов в механизме противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина - ГИЖ-298 в условиях модели судорог.

Опыты проведены на беспородных мышах самцах массой тела 22-24 г. и крысах самцах массой тела 220-250 г. Характеристики связывания 5-HT_{2A}-, NMDA- и mGluII-рецепторов определяли в структурах мозга (сенсомоторная кора, гиппокамп) крыс, а D_2-рецепторов – в структурах мозга (сенсомоторная кора, стриатум) мышей.

Крысы были разделены случайным образом на 4 группы: 1) Интактный контроль, получали физиологический раствор 1дн, n=8; 2) ГИЖ-298 без МЭШ (60 мг/кг/1дн / в/б), n=8; 3) контроль МЭШ 1дн, получали физиологический раствор 1дн, n=8; 4) МЭШ 1дн+ ГИЖ-298 (60 мг/кг/1дн/ в/б), n=11. ГИЖ-298 вводили однократно (1 дн) за 40 мнут до МЭШ.

Мыши были разделены случайным образом на 4 группы: 1) Интактный контроль, получали физиологический раствор 5 дн, n=8; 2) ГИЖ-298 (60 мг/кг/5дн / в/б), n=8; 3) контроль МЭШ 5 дн, получали физиологический раствор 5дн, n=14; 4) МЭШ 5дн + ГИЖ-298 (60 мг/кг/5дн/ в/б), n=8. ГИЖ-298 вводили 5 дней (5 дн), при последнем введении за 40 минут до МЭШ.

Через 5 минут после МЭШ животных декапитировали и извлекали на льду структуры мозга. Процедуры извлечения биологического материала, выделение плазматических мембран, анализа радиолигандного связывания и проведение теста МЭШ изложены в разделе «Материалы и методы».

Исследование влияния ГИЖ-298 на характеристики связывания 5-НТ$_{2A}$-, NMDA- и mGluII-рецепторов у крыс

Однократное нанесение МЭШ у крыс вызывало развитие тонико-клонических судорог, которые заканчивались тонической экстензией передних и задних конечностей в 87,5% случаев. ГИЖ-298 достоверно снижал выраженность судорожных реакций, вызванных МЭШ, и уменьшал количество крыс с полной тонической экстензией конечностей (таблица 48).

Таблица 48 - Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на выраженность судорожных проявлений у крыс в тесте антагонизма с МЭШ (однократно)

Группа крыс	Баллы судорожных реакций	Количество крыс с тонической экстензией % / а.е.
МЭШ, однократно	2,88 ± 0,11	87,5 (7/8)
МЭШ + ГИЖ-298, однократно	2,18 ± 0,15*	28 (3/11)#

Примечания: *- достоверность значений от группы «МЭШ», при P≤0,05 (критерий Манна-Уитни); # – достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) при P≤0,05 (точный критерий Фишера); баллы - 0 баллов - отсутствие судорог; 1 балл - клонус передних конечностей без рефлекса переворачивания; 2 балла – клонус передних и задних конечностей с потерей рефлекса переворачивания; 3 балла - тоническая экстензия передних и задних конечностей; 4 - тоническая экстензия передних и задних конечностей, заканчивающаяся гибелью.

В мозге крыс, перенесших однократно МЭШ, наблюдалось увеличение плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе до 2753±193 фмоль/мг (на 27%) по отношению к контролю без МЭШ (2161±105, соответственно) и снижение метаботропных глутаматных рецепторов mGluII в коре до 1149±49 фмоль/мг (на -25%) относительно контроля (1529±69, соответственно). При изучении 5-НТ$_{2A}$-рецепторов во фронтальной коре крыс было показано, что их плотность не изменялась под воздействием МЭШ (таблица 48). ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг при однократном введении в условиях МЭШ не влиял на измененные показатели глутаматергических рецепторов – NMDA (в гиппокампе) и mGluII (во фронтальной коре), а также не влиял на их количество без воздействия МЭШ. Плотность 5-НТ$_{2A}$-рецепторов во фронтальной коре крыс также не изменялась под воздействием ГИЖ-298 как в условиях нормы, так и после МЭШ (таблица 49).

Исследования величин константы диссоциации (Kd) показало, что ГИЖ-298 не изменял степень сродства исследуемых рецепторов к соответствующим лигандам (нМ) - [^{3}H]МК-801(+) (NMDA), [^{3}H]LY 354740 (mGluII), [^{3}H]Ketanserin (5-НТ$_{2A}$) относительно значений контрольной группы крыс (таблица 49).

Таблица 49 - Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг/однократно) на глутаматные и серотониновые рецепторы в структурах мозга крыс (кора, гиппокамп) в тесте МЭШ

Рецепторы	Константы связывания	Контроль (физ. р-р)	ГИЖ-298	МЭШ	ГИЖ-298+МЭШ
NMDA гиппокамп	Bmax, фмоль/мг белка	2161±105	2204±90	2753±193*	2481±71*
	Kd, нМ	8,0±1,2	8,3±0,9	9,6±1,3	8,8±1,3
mGluII кора	Bmax, фмоль/мг белка	1529±69	1398±53	1149±49*	1156±49*
	Kd, нМ	90,8±18,2	98,1±12	102,0±19,4	99,4±18,1
5-HT_{2A} кора	Bmax, фмоль/мг белка	746±35	785±37	790±33	776±71
	Kd, нМ	13,44±1,4	15,2±1,2	13,9±2,3	14,5±2,5

Примечание: * - статистически значимые отличия от контроля при P≤0,05 (критерий Стьюдента).

Исследование влияния ГИЖ-298 на характеристики связывания D2-рецепторов у мышей

При субхроническом 5-дневном нанесении МЭШ через корнеальные электроды около 70% мышей демонстрировали тонико-клонические судорожные реакции. На фоне ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг/5дней наблюдалось значительное снижение тяжести судорожных реакций и полная защита от развития тонической экстензии конечностей (таблица 50).

Таблица 50 - Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг/5дней) на выраженность судорожных проявлений у мышей в тесте МЭШ (5 дней)

Группа мышей	Баллы судорожных реакций	Количество крыс с тонической экстензией % / a.e.
МЭШ, 5-й день	2,7 ± 0,29	71 (10/14)
МЭШ+ГИЖ-298, 5-й день	0,4 ± 0,18**	0 (0/8) #

Примечания: данные в таблице представлены за 5-й день эксперимента. ** - достоверность значений от группы «МЭШ», при P≤0,01 (критерий Манна-Уитни); # – достоверность различий с контрольной группой (МЭШ) при P≤0,05 (точный критерий Фишера).

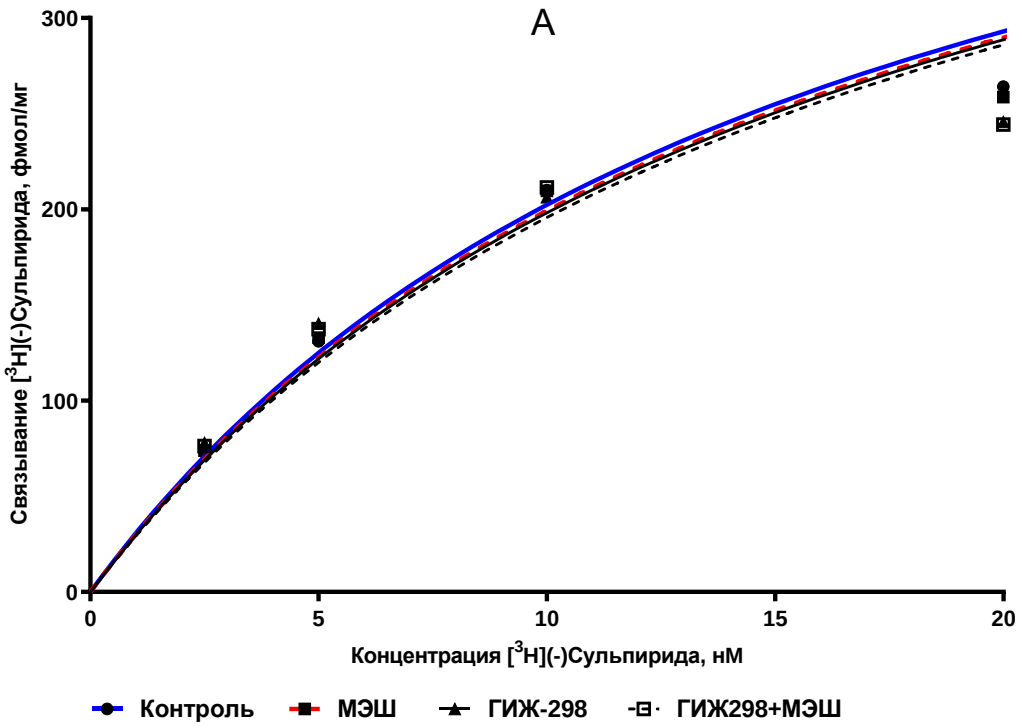
Изучение характеристик связывания с D_2-рецепторами проводили в стриатуме и коре мышей. Установлено, что МЭШ (5 дней) снижал до 660±7,0 фмоль/мг по отношению к контролю (797±21, соответственно) характеристики связывания [^{3}H](-)Сульпирида с D_2 рецепторами стриатума мышей, однако, не влиял на данный показатель во фронтальной коре (таблица 51, рисунок 46).

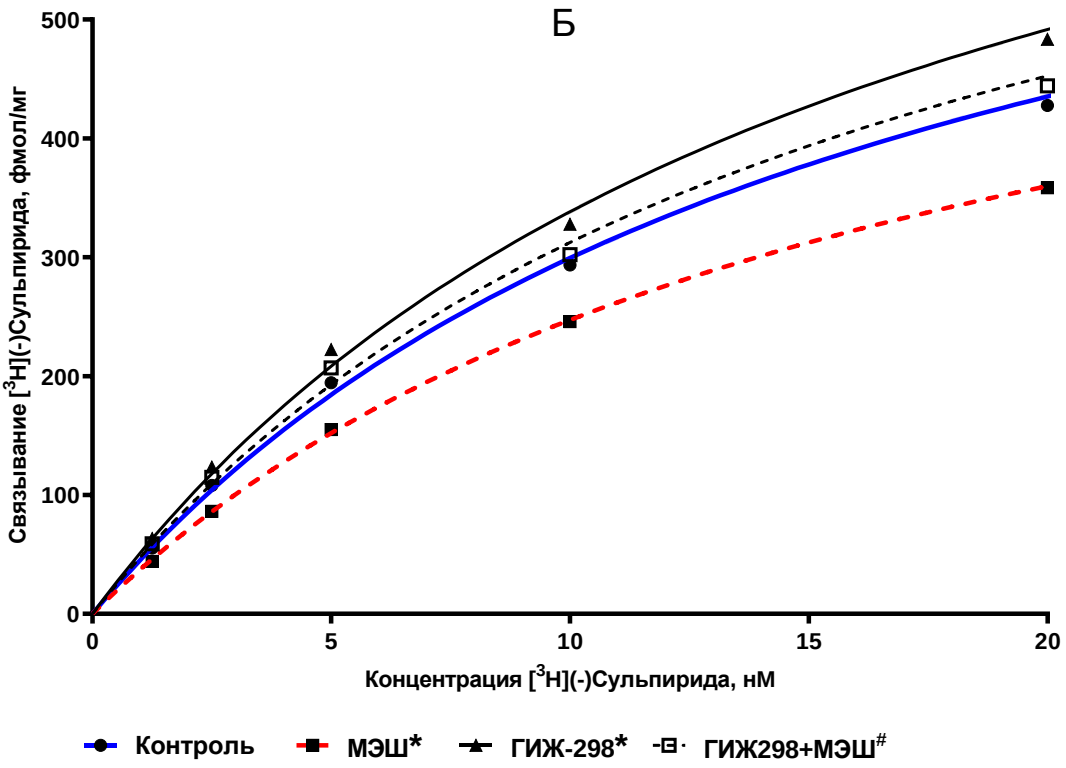
После субхронического введения ГИЖ-298 (5 дней) в дозе 60 мг/кг на фоне МЭШ и без МЭШ при определении мест связывания для [3H](-)Сульпирида с D2-рецепторами было установлено, что в коре не наблюдалось статистически значимых отличий величины Bmax для D2-рецепторов от контрольной группы с МЭШ и без МЭШ. В стриатуме ГИЖ-298 статистически достоверно увеличивал до на 24% плотность D2-рецепторов по сравнению с группой животных с МЭШ. Кроме того, в данной структуре ГИЖ-298 статистически достоверно (на 13%) увеличивал количество D_2-рецепторов у интактных животных без МЭШ. ГИЖ-298 не изменял величину Kd по сравнению с контролем (таблица 51, рисунок 46).

Таблица 51 - Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) на D_2-дофаминовые рецепторы в структурах мозга мышей (кора, стриатум) в тесте МЭШ (5 дней)

Рецепторы	Константы связывания	Контроль (физ. р-р)	ГИЖ-298	МЭШ	ГИЖ-298+МЭШ
D_2, кора	Bmax, фмоль/мг белка	554±91	533±89	529±62	505±77
	Kd, нМ	17,8±2,2	16,9±3,1	16,6±2,2	15,4±2,7
D_2, стриатум	Bmax, фмоль/мг белка	797±21	899±30*	660±7,0*	821±29#
	Kd, нМ	16,8±1,0	16,6±1,2	16,7±0,3	16,3±1,3

Примечание - данные в таблице представлены за 5-й день эксперимента; * - статистически значимые отличия от контроля при P≤0,05 (t-критерий Стьюдента); # P≤0,05 статистически значимое отличие от группы МЭШ (t-критерий Стьюдента).





Примечание - * P≤0,05 статистически значимое отличие от контрольной группы, # P≤0,05 статистически значимое отличие от группы МЭШ (t-критерий Стьюдента).

Рисунок 46 - Характеристики связывания [^{3}H](-)Сульпирида с D_2-рецепторами коры (А) и стриатума (Б) мышей под влиянием введения ГИЖ-298 на фоне МЭШ (5 дней)

Таким образом, установлено, что в мозге крыс, после тонико-клонических судорог, вызванных однократным корнеальным воздействием максимального электрошока (МЭШ), наблюдается увеличение плотности (Bmax) NMDA-рецепторов в гиппокампе и снижение количества mGluII-рецепторов ($mGluR_{2/3}$) во фронтальной коре. В тестах на мышах субхроническое воздействие МЭШ снижает плотность (Bmax) D_2-рецепторов в стриатуме. ГИЖ-298 (60 мг/кг/однократно) не противодействует, вызванному МЭШ, количественному изменению глутаматных рецепторов и не влияет на них в условиях нормы, без МЭШ. ГИЖ-298 (60 мг/кг/5 дней) препятствует снижению количества D_2-рецепторов на мембранах стриатума, а также на 13% увеличивает их количество у мышей без МЭШ в той же структуре.

Полученные данные свидетельствуют о выраженных изменениях функциональной активности NMDA, mGluII и D2 рецепторов в мозге животных перенесших судороги. Противосудорожные эффекты ГИЖ-298 сопровождаются восстановлением количества D2-рецепторов в стриатуме.

9.2 Исследование влияния ГИЖ-298 на активность ERK1/2 киназ и синапсина I у мышей в тесте судорог, вызванных МЭШ

ERK1/2 киназы высокочувствительные ферменты, участвующие в нейрональной активности и вовлекаемые в различные формы синаптической пластичности и судорожные состояния [152]. Модуляция активности ERK1/2 киназ осуществляется за счет стимуляции D1 и D2 рецепторов [112]. Ввиду того, что ГИЖ-298 увеличивает количество D2 рецепторов у животных перенесших МЭШ и у интактных животных, было интересно изучить влияние соединения на активность фермента ERK1/2 киназ в мозге мышей, перенесших судороги. Определение уровней фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I проводили с помощью иммуноблотинга в стриатумах мышей, извлечение которых осуществляли через 5 минут после МЭШ, и в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Процедура мммуноблотинга описана в разделе «Материалы и методы». Все эксперименты были независимо повторены несколько раз.

Животные, подвергнутые МЭШ в течение 5 дней, при последней экспозиции электрошоком развивали тонико-клонические судороги в 62,5% случаев. ГИЖ-298 (60 мг/кг) и вальпроевая кислота (200 мг/кг) устраняли тоническую экстензию конечностей, вызванную МЭШ, и снижали общий балл выраженности судорожных реакций (таблица 52).

Таблица 52 – Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) и ВК при 5 кратном введении на судорожные проявления мышей, вызванные МЭШ

Группа животных	Баллы судорожных реакций	Количество мышей с тонической экстензией % / a.e.
МЭШ 5дн	2.62 ± 0.12	10/16
МЭШ 5дн+ГИЖ-298 5дн	1.0 ± 0.20**	0/20
МЭШ 5дн+ВК 5дн	0.33 ± 0.16**	0/9

Примечания: 0 баллов - отсутствие судорог; 1 балл - клонус передних конечностей без рефлекса переворачивания; 2 балла – клонус передних и задних конечностей с потерей рефлекса переворачивания; 3 балла - тоническая экстензия передних и задних конечностей; 4 - тоническая экстензия передних и задних конечностей, заканчивающаяся гибелью; 2 **- достоверность значений от группы «МЭШ», при $P \leq 0{,}01$ (критерий Краскела -Уоллиса).

Исследование влияния ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты на активность ERK 1/2 киназ в стриатуме мышей

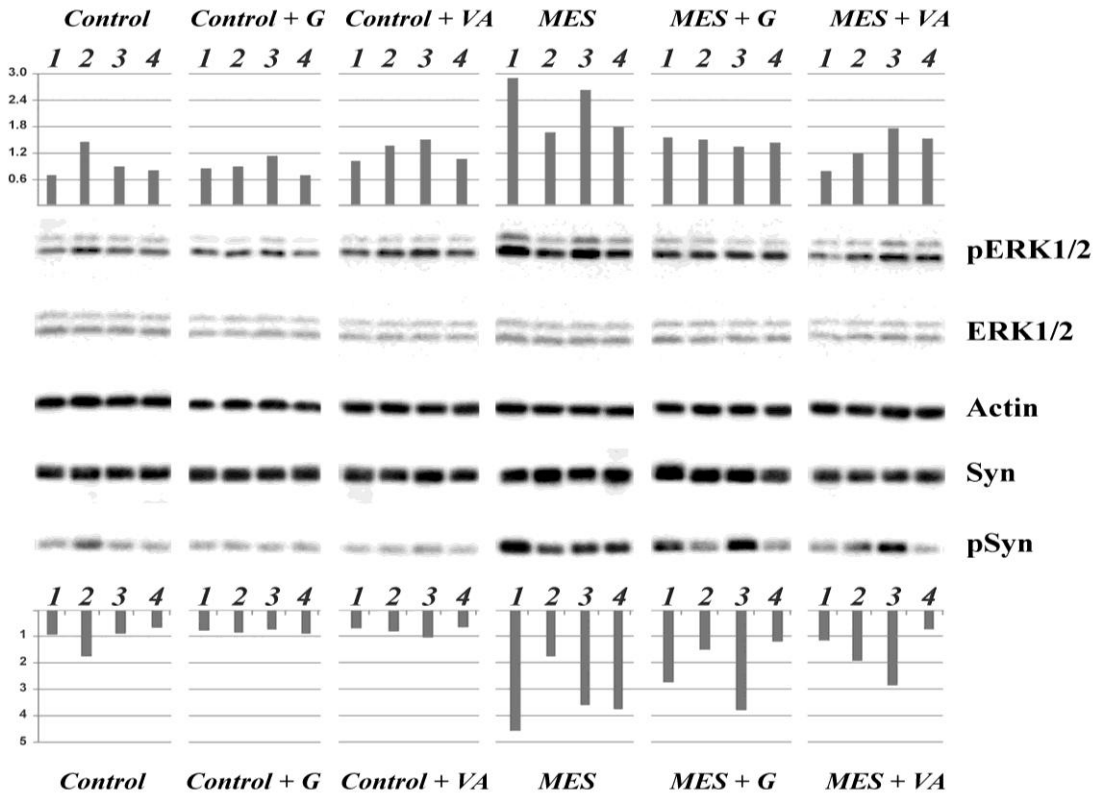
Для проведения иммуноблотинга в стриатумах животные были случайным образом разделены на 6 групп: контрольная группа получала плацебо (физ.р-р), n = 23; две контрольные группы получали ГИЖ-298 (в дозе 60 мг/кг/5 дней, внутрибрюшинно) или вальпроевую кислоту (ВК, в дозе 200 мг/кг/5 дней, внутрибрюшинно), n = 12 и 8 соответственно; 1 группа

подвергалась МЭШ, n = 16; одну группу подвергали МЭШ и вводили ГИЖ-298 (в дозе 60 мг/кг/5 сут, внутрибрюшинно), n = 20; 1 группа подвергалась МЭШ и лечению ВК (в дозе 200 мг/кг/5 дней, внутрибрюшинно), n = 9.

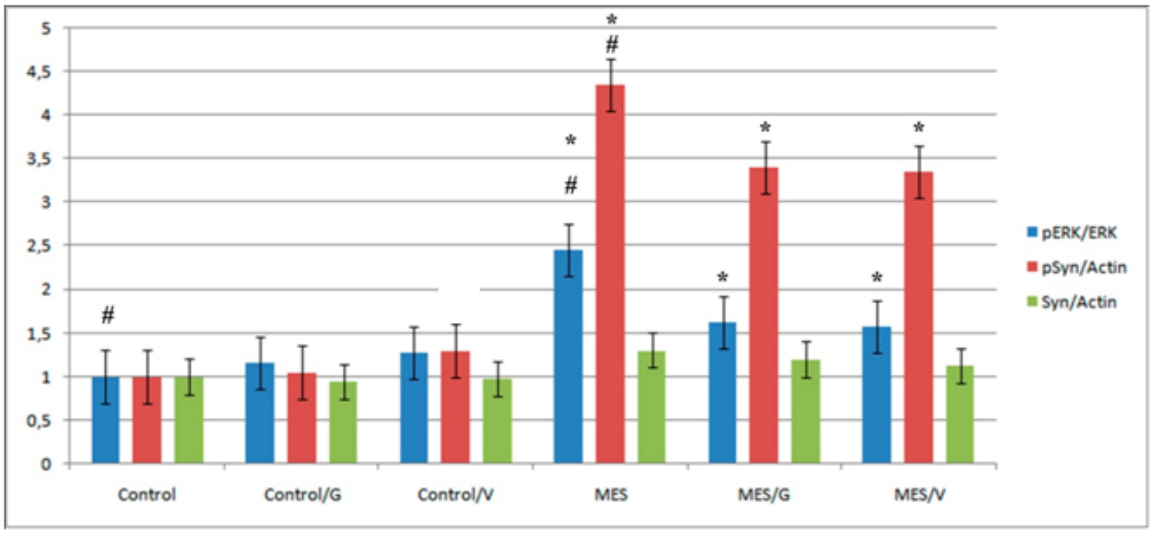
Изучение активности ERK 1/2 киназ в стриатуме мышей показало, что в контрольной группе животных (без МЭШ) наблюдался низкий уровень фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I. ГИЖ-298 или вальпроевая кислота у животных, не подвергнутых МЭШ, не вызывали изменений уровня фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I (рисунок 47).

После МЭШ (5 дней) уровень фосфо-ERK1/2 повышался в среднем в 2.5 раза. Уровень синапсина I, фосфорилированного по положениям Ser62/67, являющимся субстратами для ERK1/2, после МЭШ возрастал в среднем более чем в 4 раза. При этом наблюдался высокий индивидуальный разброс как в базальном уровне фосфо-ERK1/2 и фосфо-синапсина I (у контрольных животных), так и в повышении фосфорилирования ERK1/2 и синапсина после МЭШ в стриатуме (рисунок 47).

ГИЖ-298, так и вальпроевая кислота, у животным, подвергнутым МЭШ, приводил к снижению уровня фосфо-ERK1/2 в среднем в 1.5 раза по сравнению с животными, подвергнутыми МЭШ и получавшими физиологический раствор. Уровень фосфорилирования синапсина I в среднем снижался на 25%, как при введении ГИЖ-298, так и вальпроевой кислоты. Также как в случае контрольных и МЭШ животных, после введения соединений наблюдался индивидуальный разброс в уровнях фосфорилирования как ERK1/2, так и синапсина I. Разброс уровней фосфо-ERK1/2 и фосфо-синапсина I относительно среднего у некоторых животных после МЭШ и терапии ГИЖ-298 и вальпроевой кислотой может объясняться не только индивидуальной чувствительностью к электрошоку или действию препарата, но и исходным уровнем фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I, оптимальным для данного конкретного животного. Общий уровень ERK1/2 и синапсина I при этом достоверно не меняется ни после МЭШ, ни на фоне действия ГИЖ-298 или вальпроевой кислоты. Между уровнем фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I наблюдалась четкая корреляция (рисунок 47).



A



B

Примечания: А – индивидуальные различия уровня фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I у интактных мышей (control), при реакции на максимальный электрошок (MES) и на действие двух веществ с противосудорожной активностью, ГИЖ-298 (G) и вальпроевой кислоты (VA, V).

В – усредненные значения уровней фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I на уровне экспериментальных групп (относительные единицы). pERK1/2 – фосфорилированная ERK1/2, ERK1/2 – общая ERK, pSyn – фосфорилированный синапсин I, Syn – общий синапсин I. Уровень фосфо-ERK1/2 нормализован по общей ERK1/2, уровень фосфо-синапсина I нормализован по актину и общему синапсину. #P≤0.01; * P ≤ 0.05.

Рисунок 47 - Влияние ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты на уровень фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I

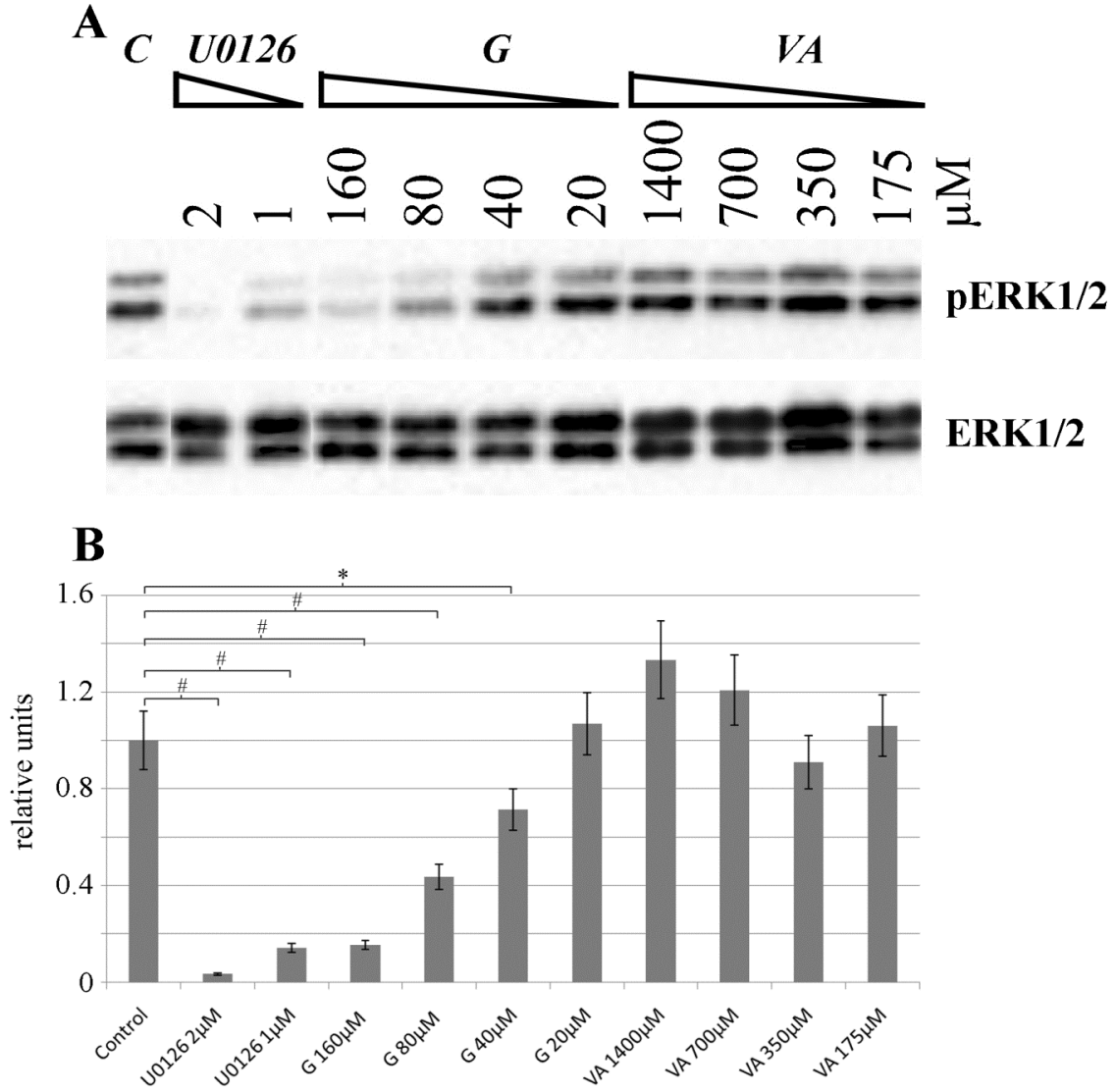
Таким образом, МЭШ-индуцированные судороги многократно усиливают активность фермента ERK1/2 и синапсина I в стриатуме мышей, тогда как ГИЖ-298, как и вальпроевая кислота, снижают уровни фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I у мышей, подвергнутых действию МЭШ.

Исследование влияния ГИЖ-298 на активность ERK 1/2 киназ в клетках нейробластомы

Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y высевали в культуральные чашки диаметром 90 мм и выращивали во влажной атмосфере с добавлением ретиноевой кислоты (см раздел «Материалы и методы»). На клетки воздействовали ингибиторами МЕК U0126, ГИЖ-298 и ВК. Соединения растворяли в ДМСО.

Для проверки гипотезы, что в основе действия ГИЖ-298 лежит прямое ингибирование звеньев ERK1/2-каскада был проведен опыт по действию ГИЖ-298 на клетки нейробластомы человека SH-SY5Y. Параллельно использовали стандартный ингибитор MEK-ERK1/2-каскада U0126 (Sigma), а также вальпроевую кислоту.

На рисунке 48 видно, что U0126 и ГИЖ-298 снижали уровень фосфорилирования ERK1/2 в клетках SH-SY5Y в дозозависимой манере. Вальпроевая кислота в концентрациях, близким к терапевтическим, не вызывала значимых изменений уровня фосфорилирования ERK1/2 в клетках SH-SY5Y. Общий уровень ERK1/2 не изменялся при действии ни у одного из трех используемых веществ (рисунок 48). При этом ГИЖ-298 вызывал эффект, сравнимый с действием U0126 в концентрациях, превышающих эффективную концентрацию U0126 для клеток нейробластомы более, чем в 100 раз. Тем не менее, эта концентрация в культуральной среде (160мкМ) близка к терапевтическому диапазону концентраций, применявшейся для купирования судорожной реакции у подопытых мышей (рисунок 48).



Примечания: A – результат иммуноблоттинга, B – уровень фосфо-ERK1/2, нормализованной по общей ERK1/2; C – контроль (control), G - ГИЖ-298, VA – вальпроевая кислота, pERK1/2 – фосфорилированная ERK1/2, ERK1/2 – общая ERK; # $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим апостериорным критерием Стьюдента-Ньюмана-Кейлса).

Рисунок 48 - Действие и вальпроевой кислоты (VA) на культуру клеток SH-SY5Y

Таким образом, субхроническое воздействие МЭШ (5 дней) вызывает повышение уровня фосфорилирования ERK1/2 (в среднем в 2.5 раза) и синапсина I (более чем в 4 раза) в стриатуме. ГИЖ-298, как и вальпроевая кислота, у животных в стриатуме снижает уровни фосфо-ERK1/2 и фосфо-синапсина I в среднем на 25%. ГИЖ-298 подавляет фосфорилирование ERK1/2 киназ в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y в концентрациях близких к терапевтическим, свидетельствуя о его прямом ингибирующем влияниии на звенья каскада фермента. В то время как вальпроевая кислота не ингибирует фосфорилирование киназы в культуральной среде**.**

9.3 Исследование нейрохимического механизма противосудорожного действия соединения ГИЖ-298 в сравнении с топираматом в условиях модели судорог МЭШ

Целью исследования было изучить влияние ГИЖ-298 на уровень и оборот моноаминов (катехоламины и индоламины), после нарушений, вызванных МЭШ, в структурах мозга крыс (фронтальная кора, стриатум, прилежащее ядро, гиппокамп и гипоталамус). Исследование проведено на половозрелых аутбредных крысах самцах, массой 250-270 г. Животные были разделены на 6 групп: интактный контроль (n=8); ГИЖ-298 (n=8); топирамат (n=8); контроль МЭШ (n=8); МЭШ + ГИЖ-298 (n=11); МЭШ + Топирамат (n=8). Крыс декапетировали через 5 минут после МЭШ. На льду извлекали структуры мозга, определяли содержание моноаминов и их метаболитов методом ВЭЖХ/ЭД согласно методике, описанной в разделе «Материалы и методы».

У 88% животных контрольной группы, которым вводили физиологический раствор, в ответ на электросудорожное раздражение (МЭШ) наблюдалась тоническая экстензия передних и задних конечностей. ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг значительно ослаблял интенсивность судорожных проявлений, вызванных МЭШ, при этом количество животных с полной тонической экстензией снижалось до 28%, соответственно статистически достоверно снижалась интенсивность судорог в баллах. Препарат сравнения топирамат в дозе 100 мг/кг так же, как и ГИЖ-298, препятствовал развитию судорожных реакций, вызванных МЭШ, что проявлялось в уменьшении количества крыс с полным тонусом конечностей до 12,5% относительно числа контрольных животных с МЭШ (таблица 53).

Таблица 53 - Влияние ГИЖ-298 (60 мг/кг) и топирамата (100 мг/кг) на выраженность судорожных проявлений у крыс в тесте антагонизма с МЭШ

Группа животных, n	Доза, мг/кг	Судорожные проявления в баллах	Количество крыс с тонусом передних и задних конечностей (%)
МЭШ (Контроль), n=8	-	2.88 ± 0.11	7/8 (87,5)
МЭШ+ГИЖ-298, n=11	60	2.18 ± 0.15*	3/11 (28)#
МЭШ+Топирамат, n=8	100	2.00 ± 0.18*	1/8 (12,5)#

Примечания: 1 балл - клонус передних/клонус задних конечностей, 2 балла - тонус передних/клонус задних конечностей, 3 балла - тонус передних/тонус задних конечностей; * - достоверность различий с контрольной группой (МЭШ), при $P \leq 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса); #- достоверность различий с контрольной группой (МЭШ), при $P \leq 0,05$ (точный критерий Фишера).

При исследовании нейрохимических эффектов ГИЖ-298 у интактных животных отмечалось увеличение концентрации метаболитов ДА - ДОФУК и ГВК во фронтальной коре (ФК). В стриатуме снижалась величина показателей скорости метаболизма дофамина - ДОФУК/ДА, что говорит о снижении скорости утилизации ДА в данной структуре. Наблюдались также изменения параметров серотонинергической нейропередачи, в частности, возрастала концентрация метаболита серотонина 5-ОИУК в гиппокампе и гипоталамусе, а также отмечалось увеличение показателя 5-ОИУК/ 5-ОТ в стриатуме, что говорит об усилении утилизации серотонина в данной структуре (таблицам 54).

Топирамат не влиял на уровни катехоламинов в ФК, стриатуме и гиппокампе, но изменял концентрации метаболитов ДА при неизменном уровне самого нейротрансмиттера. В прилежащем ядре (ПЯ) отмечалось увеличение уровня ДОФУК, а в гипоталамусе - величины комплексного показателя ГВК/ДА (таблица 54).

МЭШ вызвал существенные изменения нейрохимических параметров норадренергической, дофаминергической и серотонергической систем. В ФК, гипоталамусе, ПЯ и стриатуме наблюдалось увеличение как содержания метаболитов дофамина ДОФУК (в ФК, ПЯ и стриатуме), ГВК (в ПЯ и стриатуме), так и показателей их метаболизма - индексов ДОФУК/ДА (в гипоталамусе, ПЯ и стриатуме) и ГВК/ДА (в ПЯ и стриатуме), что свидетельствует об усилении функциональной активности дофаминергической системы в структурах мозга, относящихся к разным нейрональным путям. МЭШ снижал концентрации НА в ФК на 10% и, более существенно, на 27,5% в стриатуме. Активность серотонинергической системы изменялась в гиппокампе и стриатуме: отмечалось увеличение уровня как 5-ОИУК, так и показателя 5-ОИУК/ 5-ОТ, отражающего интенсивность утилизации серотонина (таблица 54).

ГИЖ-298 (60 мг/кг) до нанесения МЭШ влиял на параметры как дофамин-, так и норадренергической систем. В стриатуме наблюдалось снижение показателей ДОФУК/ДА и ГВК/ДА, возрастание которых отмечалось в группе крыс с МЭШ. Аналогичным образом, ГИЖ-298 препятствовал снижению уровня НА в стриатуме, вызванному МЭШ, увеличивая содержание нейротрансмиттера до значений интактного контроля. Эффект ГИЖ-298 на активность серотонинергической системы мозга у крыс с воздействием МЭШ проявлялся слабее. Наблюдалось увеличение концентрации 5-ОИУК в гиппокампе, тогда как у животных, получавших ГИЖ-298 без нанесения МЭШ, возрастал не только данный показатель, но и увеличивался индекс 5-ОИУК/ 5-ОТ (таблица 54).

Топирамат (100 мг/кг), аналогично ГИЖ-298, вызывал возрастание уровня НА в стриатуме, но, более выраженное, и, в отличие от ГИЖ-298, топирамат не влиял на показатели метаболизма дофамина ДОФУК/ДА и ГВК/ДА в данной структуре, возрастание которых

наблюдалось в группе крыс перенесших судорожный припадок (контрольная группа с МЭШ). Кроме того, при введении топирамата, как и ГИЖ-298, отмечалось возрастание уровня 5-ОИУК в гиппокампе (таблица 54).

Таблица 54 - Влияние ГИЖ-298 и топирамата на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга инбредных крыс в условиях модели МЭШ (нмоль/мл; M ± S.E.M.)

Группы животных	ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ДА	ГВК / ДА	НА	5-ОТ	5-0ИУК	5-0ИУК/ 5-ОТ
Фронтальная кора										
Контроль	0.38 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	НПД	0.44 ± 0.06	0.49 ± 0.07	1.35 ± 0.04	4.30 ± 0.16	2.81 ± 0.18	0.65 ± 0.03
МЭШ	0.30 ± 0.02	**0.18 ± 0.01***	0.18 ± 0.02	НПД	**0.60 ± 0.03***	0.58 ± 0.06	**1.21 ± 0.04***	4.45 ± 0.21	**3.29 ± 0.14***	0.74 ± 0.04
ГИЖ-298	0.34 ± 0.03	**0.18 ± 0.01***	**0.25 ± 0.02***	НПД	0.55 ± 0.03	0.76 ± 0.12	1.36 ± 0.06	4.26 ± 0.19	3.09 ± 0.14	0.73 ± 0.04
МЭШ+ ГИЖ-298	0.39 ± 0.04	**0.19 ± 0.00****	**0.23 ± 0.03***	НПД	0.53 ± 0.04	0.62 ± 0.07	1.25 ± 0.04	4.52 ± 0.08	**3.53 ± 0.08****	**0.78 ± 0.02****
ТМ	0.36 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.02	НПД	0.46 ± 0.04	0.45 ± 0.05	1.32 ± 0.06	4.31 ± 0.17	3.10 ± 0.10	0.73 ± 0.05
МЭШ+ТМ	**0.43 ± 0.04#**	**0.19 ± 0.01****	0.22 ± 0.02	НПД	**0.46 ± 0.05**$^{\#}$**	0.56 ± 0.07	1.26 ± 0.04	4.47 ± 0.10	**3.57 ± 0.11****	**0.80 ± 0.03****
Гипоталамус										
Контроль	2.50 ± 0.18	0.39 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.06	0.16 ± 0.01	0.05 ± 0.01	6.48 ± 0.71	5.16 ± 0.49	6.74 ± 0.71	1.30 ± 0.03
МЭШ	1.98 ± 0.18	0.46 ± 0.05	0.23 ± 0.06	0.08 ± 0.02	**0.24 ± 0.02****	**0.11 ± 0.03***	6.72 ± 0.26	5.41 ± 0.20	7.75 ± 0.31	1.44 ± 0.05
ГИЖ-298	2.16 ± 0.12	0.42 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.20 ± 0.01	**0.12 ± 0.02***	6.80 ± 0.34	5.58 ± 0.16	**8.12 ± 0.25***	1.46 ± 0.06
МЭШ+ ГИЖ-298	2.26 ± 0.18	0.47 ± 0.03	**0.35 ± 0.05****	0.13 ± 0.02	**0.22 ± 0.02***	**0.16 ± 0.02****	6.26 ± 0.23	5.50 ± 0.15	**7.75 ± 0.22***	1.41 ± 0.04
ТМ	2.93 ± 0.36	**0.51 ± 0.06***	0.23 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.19 ± 0.00	0.08 ± 0.01	7.19 ± 0.60	5.76 ± 0.17	**7.94 ± 0.26***	2.16 ± 0.74
МЭШ+ТМ	2.81 ± 0.38	**0.52 ± 0.03***	**0.30 ± 0.08***	0.09 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.10 ± 0.02	6.63 ± 0.45	**6.07 ± 0.36***	**8.87 ± 0.34**$^{**\#}$**	1.48 ± 0.07

Продолжение таблицы 54

Группы животных	ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ДА	ГВК / ДА	НА	5-ОТ	5-0ИУК	5-0ИУК/ 5-ОТ
Прилежащее ядро										
Контроль	13.20 ± 0.73	1.51 ± 0.09	0.67 ± 0.07	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.81 ± 0.09	1.39 ± 0.09	0.88 ± 0.06	0.65 ± 0.05
МЭШ	13.64 ± 0.91	**1.85 ± 0.16***	**0.91 ± 0.10***	0.10 ± 0.02	**0.14 ± 0.01****	**0.07 ± 0.00****	0.80 ± 0.12	1.47 ± 0.13	0.97 ± 0.08	0.67 ± 0.04
ГИЖ-298	13.51 ± 0.86	1.55 ± 0.11	0.75 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.11 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.81 ± 0.10	1.45 ± 0.13	0.92 ± 0.06	0.65 ± 0.04
МЭШ+ ГИЖ-298	13.25 ± 1.09	1.69 ± 0.13	**0.86 ± 0.06***	0.15 ± 0.07	**0.13 ± 0.00***	**0.07 ± 0.00****	0.92 ± 0.14	1.43 ± 0.09	0.95 ± 0.05	0.67 ± 0.02
ТМ	13.12 ± 0.63	1.65 ± 0.09	0.86 ± 0.05	0.04 ± 0.01	0.12 ± 0.00	**0.065 ± 0.00***	0.91 ± 0.13	1.42 ± 0.14	0.96 ± 0.07	0.69 ± 0.04
МЭШ+ТМ	12.10 ± 0.66	1.76 ± 0.06	0.85 ± 0.04	0.07 ± 0.03	**0.15 ± 0.01****	**0.07 ± 0.01****	1.15 ± 0.21	1.40 ± 0.14	1.00 ± 0.06	0.74 ± 0.04
Стриатум										
Контроль	61.16 ± 3.37	5.70 ± 0.29	61.16 ± 3.37	1.09 ± 0.09	0.09 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.72 ± 0.04	2.92 ± 0.17	3.08 ± 0.13	1.07 ± 0.04
МЭШ	59.19 ± 1.81	**6.73 ± 0.27***	**59.19 ± 1.81***	0.88 ± 0.11	**0.11 ± 0.00****	**0.08 ± 0.00****	**0.52 ± 0.04***	2.60 ± 0.13	3.39 ± 0.12	**1.32 ± 0.07***
ГИЖ-298	63.34 ± 3.86	5.31 ± 0.43	63.34 ± 3.86	0.66 ± 0.10	**0.08 ± 0.00***	0.07 ± 0.00	0.70 ± 0.10	2.81 ± 0.19	3.29 ± 0.20	1.18 ± 0.04
МЭШ+ ГИЖ-298	60.69 ± 2.85	**6.60 ± 0.36***	60.69 ± 2.85	0.80 ± 0.09	**0.10 ± 0.00**$^{\#}$	**0.07 ± 0.00**$^{\#}$	**0.71 ± 0.06**$^{\#}$	2.92 ± 0.11	3.46 ± 0.14	1.19 ± 0.04
ТМ	54.55 ± 2.35	5.10 ± 0.25	54.55 ± 2.35	1.00 ± 0.20	0.09 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.75 ± 0.08	2.32 ± 0.37	2.98 ± 0.28	1.15 ± 0.04
МЭШ+ТМ	55.17 ± 3.35	**6.68 ± 0.32***	55.17 ± 3.35	1.09 ± 0.13	**0.12 ± 0.01***	0.09 ± 0.00	**1.00 ± 0.07**$^{\#\#}$	3.22 ± 0.26	3.58 ± 0.28	**1.12 ± 0.07**$^{\#\#}$

Продолжение таблицы 54

Группы животных	ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ДА	ГВК / ДА	НА	5-ОТ	5-0ИУК	5-0ИУК/ 5-ОТ
Гиппокамп										
Контроль	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01	НПД	3.12 ± 0.10	0.60 ± 0.16	1.84 ± 0.06	3.12 ± 0.10	4.14 ± 0.17	1.33 ± 0.04
МЭШ	0.19 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.06 ± 0.01	НПД	3.21 ± 0.28	0.38 ± 0.11	1.58 ± 0.06	3.21 ± 0.28	4.13 ± 0.13	1.41 ± 0.05
ГИЖ-298	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.07 ± 0.01	НПД	3.33 ± 0.29	0.65 ± 0.24	1.74 ± 0.13	3.33 ± 0.29	**5.04 ± 0.37****	**1.53 ± 0.08***
МЭШ+ ГИЖ-298	0.18 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.07 ± 0.02	НПД	3.31 ± 0.07	0.45 ± 0.12	1.76 ± 0.07	3.31 ± 0.07	**4.91 ± 0.15**^*#	1.49 ± 0.04
ТМ	0.22 ± 0.08	**0.16 ± 0.02***	0.05 ± 0.02	НПД	3.31 ± 0.31	0.33 ± 0.14	1.93 ± 0.17	3.31 ± 0.31	4.56 ± 0.26	1.41 ± 0.08
МЭШ+ТМ	0.20 ± 0.02	**0.15 ± 0.01***	0.06 ± 0.02	НПД	3.50 ± 0.30	0.36 ± 0.13	1.85 ± 0.19	3.50 ± 0.30	**5.04 ± 0.24**^**#	1.47 ± 0.07

Примечания: приведены средние значения и стандартные ошибки (M ± S.E.M.). НПД – ниже предела детекции; ТМ – топирамат. ** - достоверность значений относительно интактного контроля без МЭШ, при P≤0,01; *-при P≤0,05 (двухфакторный дисперсионный анализ); ##-достоверность значений относительно контроля с МЭШ, при ##P≤0,01; #-при P≤0,05 (двухфакторный дисперсионный анализ).

Таким образом, конвульсивный электрошок (МЭШ) вызывает увеличение функциональной активности дофаминергической системы, проявляющееся в виде усиления скорости метаболизма ДА в стриатуме, прилежащем ядре (ПЯ), гипоталамусе и во фронтальной коре. МЭШ вызывает статистически значимое снижение уровня норадреналина (НА) во ФК и более значительно в стриатуме, что может свидетельствовать о важной роли НА в данной структуре в развитии судорожных реакций. О влиянии НА на модуляцию судорог и участие этого нейромедиатора в механизме действия известных противоэпилептических средств (ПЭП) свидетельствует тот факт, что противосудорожный эффект фенитоина, карбамазепина, фенобарбитала и вальпроата не проявляется у животных после разрушения норадренергических (НА) нейронов. ГИЖ-298 (60 мг/кг/ в/б) препятствует увеличению функциональной активности дофаминергической системы в стриатуме и снижению содержания норадреналина (НА) в той же структуре. Топирамат в дозе 100 мг/кг, так же, как и соединение ГИЖ-298, увеличивает содержание НА выше значений нормы, но не корректирует изменения функциональной активности дофаминергической нигростриарной и/или мезолимбической систем.

9.4 Изучение влияния ГИЖ-298 на баланс возбуждающих/тормозных аминокислот в структурах мозга мышей в модели судорог, вызванных МЭШ

Целью исследования было изучить влияние соединения ГИЖ-298 на уровни тормозных (глицин, ГАМК, таурин) и возбуждающих (глутамат и аспартат) нейротрансмиттерных аминокислот в структурах мозга мышей в условиях судорог, вызванных МЭШ.

В эксперименте использовали беспородных мышей самцов, массой 24-26 г.

Животных делили на группы: (1 и 2) контрольные мыши (физиологический раствор), (3 и 4) вальпроевая кислота (ВК) в дозе 200 мг/кг, (5 и 6) ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг. Исследуемые соединения вводили внутрижелудочно, однократно, за 40 минут до теста МЭШ, проведенного согласно методическим рекомендациям. При обработке результатов МЭШ использовали балльную систему оценки выраженности судорог от 0 до 4 баллов: 0 – отсутствие реакций, 1 – клонус без потери рефлекса переворачивания, 2 – клонус с потерей рефлекса переворачивания, 3 – клонико/тонические судороги, 4 – клонико/тонические судороги с гибелью.

Через 5 минут после предъявления МЭШ мышей декапитировали и извлекали такие структуры мозга, как фронтальная кора (ФК), гипоталамус (ГПТ), стриатум, гиппокамп (ГПК). Далее проводилось определение содержания нейротрансмиттеров методом ВЭЖХ/ЭД в пробах по протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы».

В контрольной группе мышей МЭШ, проведенный через корнеальные электроды, вызывал развитие тонико-клонических судорог в 89% случаев. ГИЖ-298 (60 мг/кг) устранял тонические судороги, снижая % мышей с тонической экстензией конечностей до 11% и средний балл выраженности тяжести судорог. ВК (200 мг/кг) также устраняла развитие тонической фазы судорог у 78% мышей, снижая выраженность моторных проявлений до 2,3 балла (таблица 55).

Таблица 55– Влияние ГИЖ-298 на судороги, вызванные МЭШ, в сравнении с вальпроевой кислотой (ВК)

Группа животных	Доза, мг/кг /внутрь	Баллы выраженности судорожных реакций	Количество животных с тонической экстензией конечностей, % (а.е.)
Контроль	-	-	-
ГИЖ-298	60	-	-
ВК	200	-	-
Контроль с МЭШ	-	3,17 ± 0,16	89 (8/9)
ВК+МЭШ	200	2,33 ± 0,27*	22 (2/9)$^{@}$
ГИЖ-298+МЭШ	60	1,56 ± 0,28**	11 (1/9)$^{@@}$

Примечания: *,** – при p ≤0,05, p ≤0,01 достоверность отличий относительно группы контроля с МЭШ (двухфакторный дисперсионный анализ); $^{@}$, $^{@@}$ – при P≤0,05, P≤0,01 достоверность отличий относительно группы контроля с МЭШ (точный критерий Фишера).

Во фронтальной коре (ФК) и стриатуме процедура МЭШ не вызвала каких-либо изменений содержания нейротрансмиттерных аминокислот. В гипоталамусе МЭШ приводил к снижению уровней аспартата, глицина, ГАМК и соотношения «ГАМК/глутамат», также наблюдалась тенденция к уменьшению содержания таурина. В гиппокампе процедура МЭШ вызывала уменьшение концентрации глутамата, глицина и таурина (таблица 56-59).

Во ФК мышей с МЭШ-индуцированными судорогами и без них, получавших ВК в дозе 200 мг/кг, не отмечалось статистически достоверных сдвигов уровней аминокислот. В гипоталамусе ВК в группе мышей без МЭШ приводила к снижению содержания аспартата. В гипоталамусе ВК при введении мышам перед нанесением МЭШ противодействовала снижению уровней ГАМК и соотношения «ГАМК/глутамат»: наблюдалось увеличение тканевого содержания ГАМК и величины показателя «ГАМК/глутамат» по сравнению с аналогичными параметрами контрольной группы с МЭШ. В стриатуме снижалось содержание аспартата у мышей, которым вводилась ВК как на фоне МЭШ, так и без него. Других изменений нейротрансмиттерных аминокислот в данной структуре под влиянием ВК не отмечалось. В гиппокампе мышей с МЭШ и без него, получавших ВК, снижалось содержание аспартата. Кроме того, у животных без МЭШ, ВК вызывал понижение уровней глутамата и таурина относительно контрольных значений (таблица 56-59).

ГИЖ-298 (60 мг/кг) во ФК снижал содержание глицина и таурина у интактных мышей. В гипоталамусе ГИЖ-298, подобно ВК, восстанавливал, сниженные МЭШ, уровни содержания ГАМК, тем самым восстанавливая баланс ГАМК/глутамат. Кроме того, в гипоталамусе соединение способствовало увеличению содержания глицина и таурина, сниженное в контрольной группе с МЭШ. В гиппокампе и стриатуме ГИЖ-298 не влиял ни на один из исследуемых показателей (таблицы 56-59).

Таблица 56 – Эффекты ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты (ВК) на содержание нейротрансмиттерных аминокислот **во фронтальной коре** в тесте МЭШ

Препарат	Аспартат	Глутамат	Глицин	Таурин	ГАМК	ГАМК/
Контроль	16,681±1,615	20,544±1,526	0,986±0,067	4,924±0,181	0,821±0,078	0,042±0,005
ВК	18,396±2,683	24,793±2,028	1,939±1,00	5,597±0,956	1,724±0,912	0,056±0,021
ГИЖ-298	13,291±1,65	17,075±1,23	**0,780±0,05***	**4,170±0,17***	0,623±0,05	0,041±0,00
МЭШ	14,292±1,347	17,35±1,367	0,877±0,128	4,569±0,349	0,925±0,128	0,052±0,004
ВК + МЭШ	17,071±1,978	21,801±1,869	0,868±0,053	5,019±0,395	1,064±0,109	0,051±0,006
ГИЖ-298 + МЭШ	15,871±1,09	17,374±1,08	0,733±0,02	4,180±0,27	0,854±0,06	0,052±0,01

Примечание – * – достоверность различий по сравнению с контролем, при $P \leq 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса с переходом по Данну).

Таблица 57 – Эффекты ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты (ВК) на содержание нейротрансмиттерных аминокислот **в гипоталамусе** в тесте МЭШ

Препарат	Аспартат	Глутамат	Глицин	Таурин	ГАМК	ГАМК / Глутамат
Контроль	12,026±0,469	14,476±0,583	1,469±0,046	2,829±0,164	2,331±0,128	0,161±0,006
ВК	**9,757±0,335***	15,445±0,492	1,568±0,076	2,991±0,200	2,664±0,187	0,172±0,009
ГИЖ-298	12,600±0,48	15,911±0,50	1,492±0,08	3,130±0,18	2,349±0,15	0,152±0,01
МЭШ	**9,529±0,281***	13,632±0,343	**1,251±0,049***	2,421±0,139	**1,858±0,082***	**0,136±0,004***
ВК + МЭШ	8,932±0,847	14,935±0,346	1,472±0,122	2,755±0,216	**2,437±0,222#**	**0,162±0,008#**
ГИЖ-298 + МЭШ	**11,834±0,46#**	15,375±0,69	**1,634±0,11#**	**3,359±0,25#**	**2,590±0,19#**	**0,167±0,01#**

Примечания: * – достоверность различий по сравнению с контролем, при $P \leq 0,05$; # – достоверность различий по сравнению с группой мышей, получавшей МЭШ, при $P \leq 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса с переходом по Данну).

Таблица 58 – Эффекты ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты (ВК) на содержание нейротрансмиттерных аминокислот **в стриатуме** в тесте МЭШ

Препарат	Аспартат	Глутамат	Глицин	Таурин	ГАМК	ГАМК / Глутамат
Контроль	11,350±0,630	17,202±0,977	1,084±0,064	7,495±0,394	1,504±0,009	0,088±0,004
ВК	**8,360±0,680***	17,062±1,011	1,158±0,101	7,404±0,681	1,459±0,104	0,087±0,005
ГИЖ-298	10,160±0,64	16,943±0,61	1,158±0,09	8,887±0,73	1,801±0,16	0,111±0,01
МЭШ	11,348±0,377	15,702±0,449	1,082±0,046	7,191±0,331	1,505±0,049	0,097±0,005
ВК + МЭШ	**8,529±0,346**$^{\#}$	15,295±0,448	1,072±0,062	6,771±0,394	1,565±0,098	0,103±0,007
ГИЖ-298 + МЭШ	10,578±0,56	15,178±0,39	1,055±0,04	6,956±0,32	1,677±0,15	0,110±0,01

Примечания: * – достоверность различий по сравнению с контролем, при $P \leq 0,05$; # – достоверность различий по сравнению с группой мышей, получавшей МЭШ, при $P \leq 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса с переходом по Данну).

Таблица 59 – Эффекты ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты (ВК) на содержание нейротрансмиттерных аминокислот **в гиппокампе** в тесте МЭШ

Препарат	Аспартат	Глутамат	Глицин	Таурин	ГАМК	ГАМК / Глутамат
Контроль	10,313±0,379	18,402±0,400	1,152±0,039	5,848±0,142	1,197±0,064	0,065±0,004
ВК	**6,675±0,638***	**15,225±1,376***	0,949±0,109	**4,704±0,530***	1,092±0,117	0,071±0,003
ГИЖ-298	9,394±0,59	17,693±0,80	1,060±0,04	5,602±0,17	1,265±0,04	0,072±0,00
МЭШ	9,071±0,560	**15,322±0,922***	**0,966±0,057***	**4,637±0,301***	1,095±0,060	0,072±0,003
ВК + МЭШ	**6,344±0,652**$^{\#}$	14,370±1,568	0,858±0,103	4,649±0,565	1,123±0,131	0,077±0,003
ГИЖ-298	9,244±0,43	15,467±0,86	0,972±0,06	4,934±0,36	1,156±0,08	0,078±0,00

Примечания: * – достоверность различий по сравнению с контролем, при $P \leq 0,05$; # – достоверность различий по сравнению с группой мышей, получавшей МЭШ, при $P \leq 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса с переходом по Данну).

Таким образом, судороги, вызванные МЭШ, уменьшают уровни тормозных аминокислот ГАМК и глицина в гипоталамусе, нарушая баланс ГАМК/глутамат, и снижают уровни таурина и глицина в гиппокампе. ГИЖ-298 оказывает выраженное противосудорожное действие и восстанавливает нарушенный баланс ГАМК/глутамат в

гипоталамусе, а также содержание тормозных аминокислот таурина, глицина и ГАМК. Вальпроевая кислота снижает выраженность судорог и восстанавливает уровни ГАМК и соотношение ГАМК/глутамат в гипоталамусе, при этом в стриатуме и гиппокампе препарат снижает содержание аспартата.

9.5 Изучение нейрорецепторного и нейрохимического механизмов действия соединения ГИЖ-290 в сравнении с леветирацетамом в условиях литий-пилокарпиновых судорог

Для проведения нейрохимических и нейрорецепторных исследований ГИЖ-290 и леветирацетама была выбрана модель литий-пилокарпиновых судорог (LiCl+пилокарпин), в которой отмечалась их высокая противосудорожная эффективность. Животные были случайным образом разделены на 6 групп по 7 особей в каждой: Контроль (физраствор); Леветирацетам (600 мг/кг, в/б); ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б); LiCl+пилокарпин и физраствор; LiCl+пилокарпин и Леветирацетам; LiCl+пилокарпин и ГИЖ-290. Декапитацию крыс проводили через 40 мин после последних инъекций, фронтальную кору и гиппокампы извлекали на льду для проведения хроматографического и радиолигандного анализа, процедуры которых описаны в разделе «Материалы и методы».

Изучение нейрорецепторных механизмов действия соединения ГИЖ-290 в сравнением с леветирацетамом в условиях литий-пилокарпиновых судорог

В радиолигандном анализе рассчитывали величины Bmax и Kd, а также метод вытеснения, представляющий величину IC50. Исследовали влияние ГИЖ-290 и леветирацетама на рецепторы ГАМКА-, ГАМКВ-, mGluII (во фронтальной коре) и NMDA-рецепторы в гиппокампе.

Установлено, что в мозге (фронтальная кора и гиппокамп) интактных крыс ГИЖ-290 и леветирацетам приводят к снижению плотности (Bmax) NMDA- и mGlu-рецепторов и $ГАМК_А$-рецепторов. Напротив, величина Bmax для $ГАМК_В$-рецепторов под влиянием препаратов возрастала. При этом величины константы диссоциации (Kd), отражающие аффинитет мест специфического связывания к лиганду, не изменялись (таблица 60).

Леветирацетам (600 мг/кг) уменьшал Bmax NMDA- и $ГАМК_А$ - рецепторов на 22% и 23% соответственно и увеличивал Bmax $ГАМК_В$ на 43% относительно контрольных значений (таблица 60).

ГИЖ-290 (5 мг/кг) уменьшал Bmax NMDA-, mGlu- и $ГАМК_А$ - рецепторов на 41%, 18% и 33% соответственно, при этом увеличивал Bmax $ГАМК_В$ на 113% (таблица 60).

Таблица 60 - Влияние леветирацетама (600 мг/кг) и ГИЖ-290 (5 мг/кг) на глутаматные и ГАМК-рецепторы мозга интактных крыс (M±S.E.M.)

Рецепторы	Константы связывания	Контроль	Леветирацетам	ГИЖ-290
NMDA	*Bmax, фмоль/мг*	2986 + 160	2336 + 186*	1521 + 113*
	Kd, нМ	8,0 + 1,0	9,1+,6	8,3+ 1,4
mGluII	*Bmax, фмоль/мг*	1839 + 172	1698 + 200	1510+ 167*
	Kd, нМ	91,8+18,3	105,7+25,4	99,8+23,0
$ГАМК_А$	*Bmax, фмоль/мг*	1236 + 86	949 + 64*	826 + 58*
	Kd, нМ	15,7+2,5	16,1+2,4	17,9+2,7
$ГАМК_В$	*Bmax, фмоль/мг*	209 + 11	299 + 15*	447 + 27*
	Kd, нМ	19,9+1,7	19,5+1,6	26,8+2,4

Примечание: * - статистически значимое отличие от контроля, при $P \leq 0,05$ (t-тест Стьюдента).

На рисунках 49 и 50 представлены кривые насыщения и графики Скетчарда для специфического связывания под воздействием конвульсанта пилокарпина (40 мг/кг) с предварительным (за 18 часов) введением лития хлорида (Li). Как и в случае с интактными животными, изменениям подверглись лишь величины Bmax связывания, тогда как показатели сродства рецептора к лигандам не изменились под влиянием соединений (рисунки 49,50, таблица 61).

На максимуме судорожной активности, вызванной Li+пилокарпином, плотность всех исследуемых рецепторов уменьшалась: NMDA-рецепторов на 41%, mGlu-рецепторов на 38%, $ГАМК_А$-рецепторов на 49%, $ГАМК_В$-рецепторов на 23% (рисунки 49,50, таблица 59).

Леветирацетам восстанавливал баланс рецепторов NMDA/ $ГАМК_А$, нарушенный судорогами, при этом количество NMDA рецепторов повышалось на 40%, а рецепторы $ГАМК_А$ возрастали до нормы (рисунки 49,50, таблица 61).

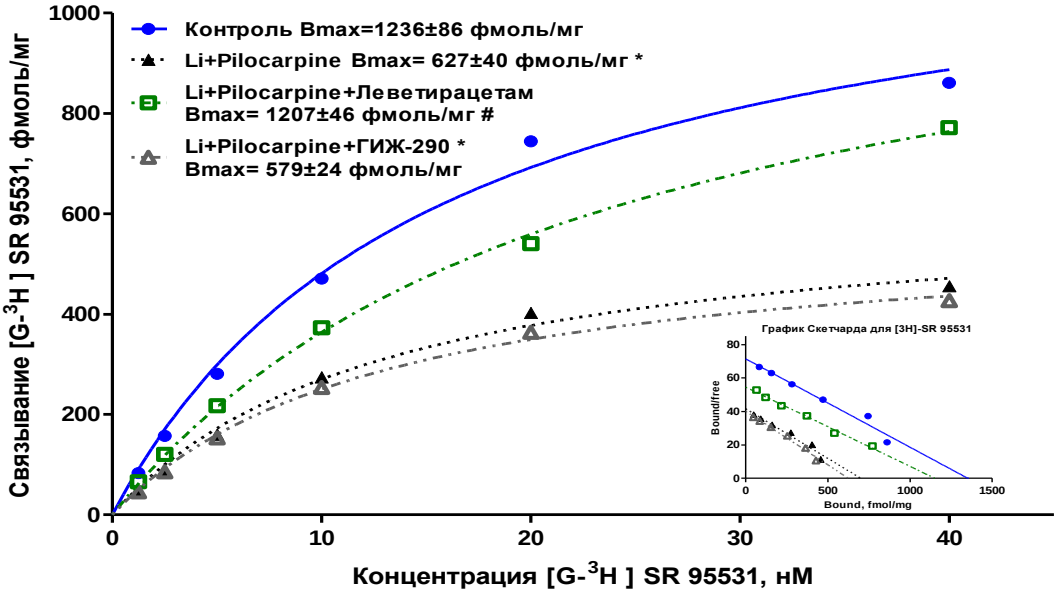
ГИЖ-290 восстанавливал плотность $ГАМК_В$-рецепторов до контрольных значений и не влиял на другие рецепторы (рисунки 49,50, таблица 61).

Таблица 61 - Влияние леветирацетама (600 мг/кг) и ГИЖ-290 (5 мг/кг) на глутаматные и ГАМК-рецепторы мозга крыс при литий-пилокарпиновых судорогах (m±S.E.M.)

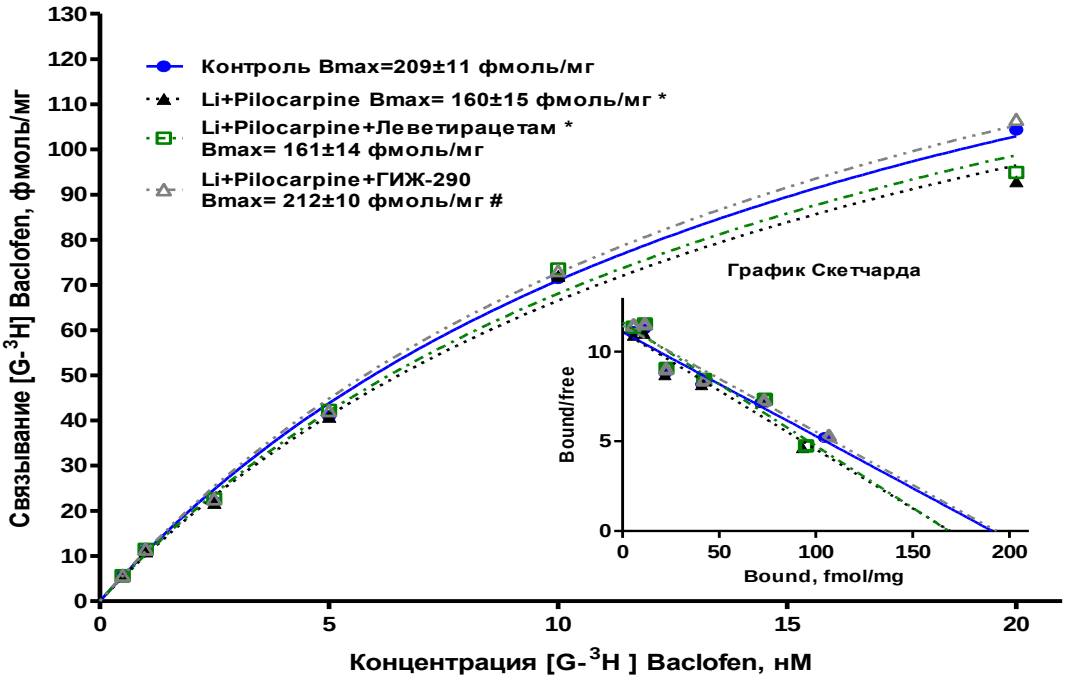
Рецеп-торы	Константы связывания	Контроль (физраствор)	Физраствор+ Li-Пилокарпин	Леветирацетам + Li-Пилокарпин	ГИЖ-290 + Li-Пилокарпин
NMDA	*Bmax, фмоль/мг*	2986 + 160	1772 + 120*	2482 + 182*#	1339 + 175*
	Kd, нМ	8,0 + 1,0	8,6 + 1,3	7,8 + 1,3	9,9 + 2,7
mGluII	*Bmax, фмоль/мг*	1839 + 172	1138 + 119*	1004 + 97*	985 + 90*
	Kd, нМ	91,8+18,3	106,3 + 22,7	103,1 + 20,5	99,5 + 19,0
$ГАМК_A$	*Bmax, фмоль/мг*	1236 + 86	627 + 40*	1207 +46#	579 + 24*
	Kd, нМ	15,7+2,5	13,2 + 2,0	15,2 + 1,8	13,2+1,3
$ГАМК_B$	*Bmax, фмоль/мг*	209 + 11	160 + 15*	161 + 14*	212 + 10#
	Kd, нМ	19,9+1,7	24,3 + 1,9	13,3 + 2,2	19,6 +1,6

Примечание - *, # - статистически значимое отличие от группы контроля и от созданной патологии (Li+пилокарпин), при P≤0,05 (t-тест Стьюдента).

а



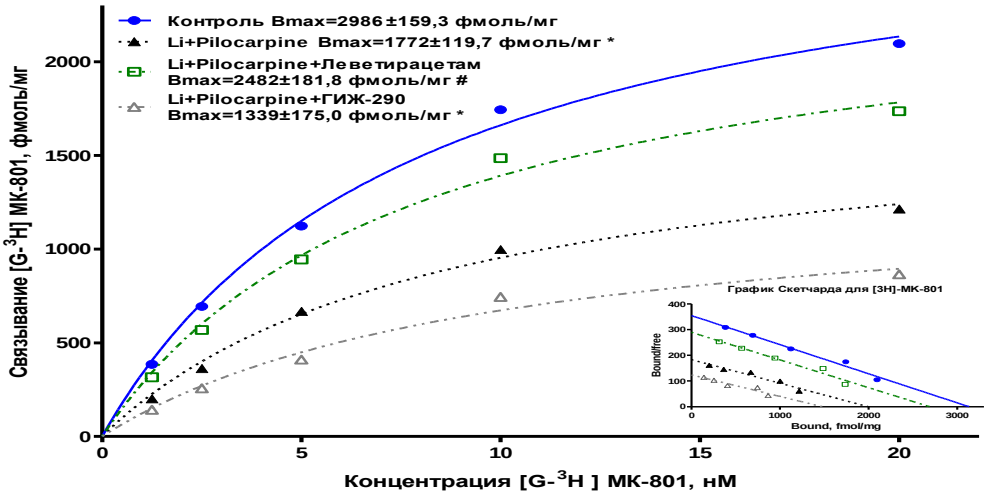
б



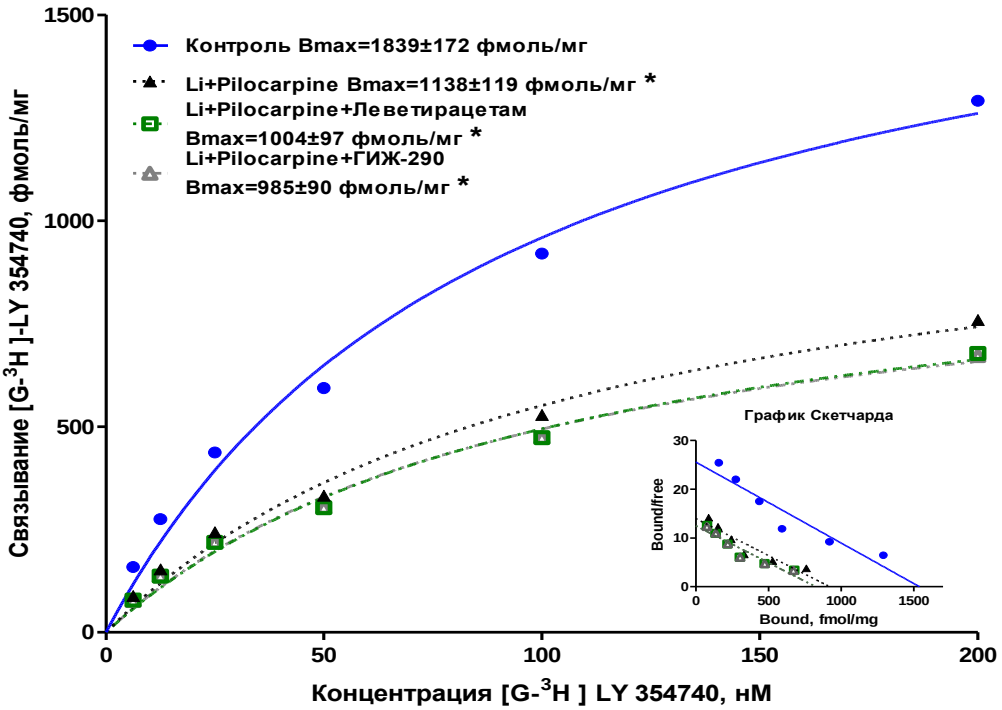
Примечание - *, # - отличие от контроля и от созданной патологии при P≤0,05 (t-тест Стьюдента).

Рисунок 49 - Связывание [^{3}H]-SR 95531 с $GABA_A$-рецепторами коры (а), [^{3}H]-Baclofen с $GABA_B$-рецепторами коры (б) крыс под влиянием введения леветирацетама и ГИЖ-290 при Li+пилокарпиновых судорогах

а



б



Примечание - *, # - отличие от контроля и от созданной патологии при P≤0,05 (t-тест Стьюдента).

Рисунок 50 - Связывание [^{3}H]-МК-801 с NMDA-рецепторами гиппокампа (а) и [^{3}H]-LY 354740 с mGluR коры (б) мозга крыс под влиянием введения леветирацетама и ГИЖ-290 при Li+пилокарпиновых судорогах

По данным анализа кривых вытеснения были рассчитаны величины концентрации каждого из двух веществ, изменяющей эффективность специфического связывания радиоактивных лигандов к ГАМК$_A$-, ГАМК$_B$-, NMDA- и mGluII-рецепторам (in vitro) на 50% относительно контроля — IC$_{50}$. Полученные величины IC$_{50}$указывают, что ни одно из изученных веществ не конкурирует со специфическими радиолигандами за места связывания рецепторов (таблица 62).

Таблица 62 - Величины IC$_{50}$ для препаратов леветирацетам и ГИЖ-290

Рецептор	Лиганд	ЛЕВ (моль/л)	ГИЖ-290 (моль/л)
ГАМК$_A$	[^{3}H]-SR95531	>10^{-4}	>10^{-4}
ГАМК$_B$	[^{3}H-G](–)баклофен	>10^{-4}	>10^{-4}
NMDA	[^{3}H-G]-МК-801	>10^{-4}	>10^{-4}
mGluRII	[^{3}H]-LY 354740	>10^{-4}	>10^{-4}

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что леветирацетам и ГИЖ-290 проявляют противосудорожное действие, используя различные нейрохимические механизмы. В частности, если маркерными рецепторами для защитного действия

леветирацетама (600 мг/кг) являются ионотропные NMDA- и $ГАМК_А$-рецепторы, то для производного 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 (5 мг/кг) таковым является метаботропный $ГАМК_В$-рецептор.

Изучение нейрохимических механизмов действия соединения ГИЖ-290 и леветирацетама в условиях литий-пилокарпиновых судорог

Проводили исследование влияния ГИЖ-290 и леветирацетама на содержание возбуждающих (глутамата и аспартата) и тормозных (ГАМК, таурина, глицина) аминокислот в гиппокампе и фронтальной коре (ФК) мозга интактных крыс и после литий-пилокарпиновых судорог.

Исследование влияния леветирацетама (600 мг/кг, в/б) на содержание возбуждающих и тормозных аминокислот во ФК и гиппокампе интактных крыс показало, что под воздействием препарата в гиппокампе происходит увеличение концентрации глутамата, глицина, а также ГАМК на 22%, 42% и 28% соответственно по сравнению с контролем (таблица 63).

ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б) проявлял тенденцию к снижению уровней глутамата и глицина в гиппокампе и статистически достоверно ГАМК (на - 26%) в той же структуре. В образцах ФК никаких значимых изменений аминокислот не наблюдалось (таблица 63).

Таблица 63 - Влияние леветирацетама и ГИЖ-290 на содержание (мкмоль/мг ткани) ароматических аминокислот в мозге интактных крыс (m+S.E.M.)

Амино-кислоты	Структура мозга	Контроль (n=15)	Леветирацетам (n=7)	ГИЖ-290 (n=7)
Аспартат	ФК	2,30+0,07	2,36+0,12	2,22+0,14
	Гиппокамп	1,66+0,09	1,88+0,15	1,42+0,08
Глутамат	ФК	7,28+ 0,20	6,95+ 0,21	7,52+ 0,39
	Гиппокамп	7,5 + 0,44	9,17+ 0,66*	6,14+ 0,51#
Глицин	ФК	3,74+0,12	3,93+0,19	3,57+0,24
	Гиппокамп	1,42+0,13	2,01+0,21*	1,05+0,07#
Таурин	ФК	12,30+0,47	11,2+0,30	13,0+0,94
	Гиппокамп	14,0+1,24	16,50+2,37	11,2+0,84
ГАМК	ФК	3,57+0,16	3,23+0,21	3,86+0,28
	Гиппокамп	5,14+0,36	6,57+0,42*	3,79+0,30*

Примечание - * - достоверность отличия от Контроля при $P \leq 0,05$ и # -тенденция к достоверности отличий от Контроля (критерий Краскела-Уоллиса с переходом по Данну).

Таким образом, значимые изменения в мозге интактных крыс наблюдаются только в гиппокампе, причём под воздействием леветирацетама содержание глутамата, глицина и

ГАМК возрастают, тогда как после введения ГИЖ-290, напротив, происходит уменьшение уровней ГАМК, а также в некоторой степени глутамата и глицина (недостоверно).

На пике судорог, вызванных Li+пилокарпином, происходит снижение концентрации аспартата во ФК (-13%) и гиппокампе (-19%), а также возрастание уровней глутамата (+10%) и глицина (+24%) во ФК (Таблица 64).

Леветирацетам не влиял на нарушения уровней содержания аминокислот, вызванных Li+пилокарпином. Однако леветирацетам способствовал увеличению уровня таурина ($p<0,1$) во ФК на 9% по отношению к патологии (таблица 64).

ГИЖ-290, также как и леветирацетам, не влиял на изменения баланса аминокислот после судорог, однако способствовал более выраженному повышению таурина во ФК на 21% относительно патологии (таблица 64).

Таблица 64 - Влияние леветирацетама и ГИЖ-290 на содержание ароматических аминокислот (мкмоль/мг ткани) в мозге крыс с вызванными литий-пилокарпиновыми судорогами

Амино-кислоты	Структура мозга	Контроль (n=15)	Li+пилокарпин (n=7)	Леветирацетам + Li+пилокарпин (n=7)	ГИЖ-290 + Li+пилокарпин (n=7)
Аспартат	ФК	2,30+0,07	2,00+0,13$^{\#}$	2,10+0,18$^{\#}$	1,83+0,05*
	Гиппокамп	1,66+0,09	1,34+0,10*	1,38+0,07$^{\#}$	1,30+0,06*
Глутамат	ФК	7,28+0,20	7,99+0,20$^{\#}$	8,00+0,37$^{\#}$	7,27+0,48
	Гиппокамп	7,50+0,44	7,64+0,38	6,93+0,47	7,46+0,41
Глицин	ФК	3,74+0,12	4,63+0,13*	4,72+0,22*	4,59+0,28*
	Гиппокамп	1,42+0,13	1,17+0,05	1,18+0,12	1,28+0,09
Таурин	ФК	12,30+0,47	13,30+0,72	14,60+1,44$^{\#}$	16,10+1,0*,$^{\wedge}$
	Гиппокамп	14,0+1,24	15,3+1,83	12,9+0,98	14,6+0,44
ГАМК	ФК	3,57+0,16	4,02+0,24	3,78+0,13	4,05+0,12$^{\#}$
	Гиппокамп	5,14+0,36	4,92+0,12	4,80+0,27	5,94+0,60

Примечание - * - достоверность и $^{\#}$- тенденция к достоверности отличия от Контроля $P\leq0,05$ и $P\leq0,1$; $^{\wedge}$ - достоверность отличия от группы Li+пилокарпин (критерий Краскела-Уоллиса с переходом на множественные сравнения).

Таким образом, различия в нейрохимических эффектах леветирацетама и ГИЖ-290 на интактных животных наблюдались во влиянии на уровни тормозных и возбуждающих аминокислот в гиппокампе: леветирацетам увеличивал концентрации глутамата (+22%), глицина (+42%) и ГАМК (+28%), тогда как ГИЖ-290 снижал уровни ГАМК на 26%. На фоне Li-пилокарпиновых судорог не отмечалось восстановления нарушения баланса ароматических аминокислот мозга, однако леветирацетам и, особенно, ГИЖ-290 увеличивали во фронтальной коре уровень тормозной аминокислоты – таурина.

9.6 Изучение нейрохимических механизмов противосудорожного действия соединения ГИЖ-332 на модели судорог, вызванных МЭШ

В исследовании использовали аутбредных мышей самцов, массой 24-26 г.

Было изучено влияние соединения ГИЖ-332 на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга (фронтальная кора, стриатум, гиппокамп и гипоталамус) мышей в условиях антагонизма с МЭШ.

Животные были разделены на следующие экспериментальные группы (n): Интактный контроль (n=8); ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг (n=8); Контроль МЭШ (n=13); МЭШ + ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг (n=9).

Соединение ГИЖ-332 (30 мг/кг) вводили животным однократно внутрибрюшинно за 35 мин до декапитации. Крысам контрольной группы вводили изотонический раствор 0,9 % NaCl. Через 30 минут части животных (3-м группам) через корнеальные электроды наносили электросудорожное раздражение (50Н/ 250 V/ 13-14 мА/0,2 с). Декапитировали животных через 5 мин после МЭШ (см. раздел «Материалы и методы»).

При обработке результатов теста максимального электрошока (МЭШ) использовали балльную систему оценки где: 0 баллов - отсутствие судорог; 1 балл - клонус передних конечностей без рефлекса переворачивания; 2 балла – клонус передних и задних конечностей с потерей рефлекса переворачивания; 3 балла - тоническая экстензия передних и задних конечностей; 4 - тоническая экстензия передних и задних конечностей, заканчивающаяся гибелью.

Нанесение электрошокового поражения (МЭШ) вызывало достоверное увеличение содержания метаболитов дофамина - ДОФУК в гипоталамусе и ГВК и 3-МТ в стриатуме. Наблюдалось увеличение содержания метаболита серотонина - 5-ОИУК в гипоталамусе (таблицы 65, 66). Эти изменения свидетельствует об усилении утилизации ДА и 5-ОТ.

ГИЖ-332 в дозе 10 мг/кг снижал количество животных с тонической экстензией до 55% (в контроле 92%) после однократного нанесения МЭШ (50 Н/ 250 V/ 13-14 мА/0,2 с), уменьшая выраженность судорожных реакций в баллах до 2.67 ± 0.20 (p=0,057) относительно контрольных значений (в контроле 3.23 ± 0.17). В то же время, на нейрохимическом уровне ГИЖ-332 практически не оказывал влияния на состояние моноаминергических систем мозга мышей, подвергнутых МЭШ, за исключением снижения содержания ДА в стриатуме. У интактных мышей ГИЖ-332 существенно снижал показатель ДОФУК/ДА в ФК (таблица 66).

Таблица 65 - Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга интактных мышей контрольной группы, Mean ± SEM

Структура мозга	ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	НА	5-ОТ	5-ОИУК	5-ОИУК/5ОТ
Фронтальная кора	2999,5 ± 1326,8	2630,5 ± 1092,4	7595,1 ± 2518,1	НПД	1,214 ± 0,344	5,018 ± 1,755	2989,0 ± 796,3	3396,9 ± 1133,6	1575,1 ± 420,5	0,645 ± 0,150
Гипоталамус	544,3 ± 215,1	579,2 ± 78,8	918,0 ± 143,9	168,0 ± 31,2	2,385 ± 0,723	4,844 ± 1,931	10726,9 ± 720,0	1905,3 ± 446,7	2214,2 ± 427,0	1,533 ± 0,251
Стриатум	51702,1 ± 8204,5	3805,1 ± 424,2	6961,6 ± 1042,7	3176,5 ± 449,3	0,685 ± 0,570	0,668 ± 0,499	1312,1 ± 114,9	1868,5 ± 239,9	12387,3 ± 9941,3	12,554 ±10,846
Гиппокамп	491,3 ± 158,8	193,5 ± 46,0	911,3 ± 172,5	НПД	0,872 ± 0,337	4,074 ± 1,491	3270,5 ± 242,3	1003,9 ± 207,5	1735,1 ± 512,7	3,280 ±1,150

Примечание - данные представлены в пмоль/мг ткани; приведены средние значения и стандартные ошибки (M ± s.e.m.).

Таблица 66 - Влияние ГИЖ-332 на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга инбредных мышей на модели максимального электрошока (МЭШ) (%, M ± s.e.m.)

Вещество	ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ДА	ГВК / ДА	НА	5-ОТ	5-0ИУК	5-0ИУК/ 5-ОТ
Фронтальная кора										
ГИЖ-332	83,8 ± 43,7	73,8 ± 37,6	91,4 ± 25,6	НПД	**27,1 ± 10,1***	138,2 ± 42,1	117,4 ± 26,3	173,0 ± 70,8	104,5 ± 34,4	66,3 ± 20,6
МЭШ	79,6 ± 41,3	71,2 ± 28,5	184,6 ±81,8	НПД	104,3 ± 26,8	288,6 ± 123,2	136,3 ± 29,8	158,6 ± 68,6	222,7 ± 114,1	86,0 ± 15,3
МЭШ + ГИЖ-332	50,1 ± 18,5	64,4 ± 27,6	165,0 ± 64,0	НПД	205,9 ± 136,6	222,7 ± 56,5	169,3 ± 25,5	173,0 ± 70,8	104,5 ± 34,4	66,3 ± 20,6
Гипоталамус										
ГИЖ-332	91,8 ± 13,0	117,8 ± 27,8	104,3 ± 10,8	124,8 ± 27,5	60,9 ± 12,0	45,6 ± 7,6	160,2 ± 64,8	87,4 ± 13,3	98,1 ± 8,8	111,7 ± 22,8
МЭШ	83,2 ± 15,6	**147,9 ± 12,8***	95,1 ± 11,7	123,3 ± 29,8	109,8 ± 18,7	52,4 ± 10,8	95,1 ± 4,1	121,2 ± 8,9	**134,5 ± 7,6***	85,6 ± 4,7
МЭШ + ГИЖ-332	108,4 ± 27,3	131,6 ± 13,9	78,8 ± 19,6	82,1 ± 15,2	99,2 ± 23,5	42,5 ± 18,6	92,3 ± 4,0	119,5 ± 16,4	114,0 ± 7,9	99,6 ± 20,1
Стриатум										
ГИЖ-332	108,9 ± 2,9	99,3 ± 6,4	106,7 ± 8,2	101,5 ± 10,5	91,3 ± 4,9	98,7 ± 6,3	95,9 ± 7,4	79,9 ± 12,2	93,2 ± 21,9	101,3 ± 16,2
МЭШ	108,2 ± 6,3	121,2 ± 12,1	**129,9 ± 9,1***	**134,0 ± 10,3***	110,2 ± 5,0	121,6 ± 5,3	112,7 ± 8,3	71,9 ± 10,2	79,1 ± 16,6	98,0 ± 12,9
МЭШ + ГИЖ-332	**87,9 ± 7,5 #**	97,0 ± 12,8	122,4 ± 10,0	122,1 ± 9,1	104,2 ± 11,3	147,1 ± 14,0	107,6 ± 8,0	93,7 ± 8,8	108,8 ± 16,6	107,6 ± 9,7
Гиппокамп										
ГИЖ-332	47,2 ± 8,5	90,9 ± 19,6	107,6 ± 15,8	НПД	130,7 ± 50,6	121,1 ± 20,6	90,2 ± 3,5	66,0 ± 10,2	52,6 ± 14,8	41,3 ± 6,7
МЭШ	92,9 ± 17,1	63,4 ± 17, 9	177,3 ± 64,3	НПД	32,1 ± 7,8	137,0 ± 45,1	84,0 ± 4,1	104,0 ± 13,1	62,7 ± 14,2	38,0 ± 12,8
МЭШ + ГИЖ-332	98,0 ± 23,6	131,7 ± 27,2	**1**64,9 ± 28,2	НПД	144,8 ± 44,7	250,2 ± 108,7	89,8 ± 8,9	111,0 ± 10,7	135,8 ± 55,9	63,8 ± 20,2

Примечание:* – достоверность различий по сравнению с контрольной группой мышей, при P≤0,05; # –достоверность различий по сравнению с группой, подвергшейся МЭШ, при P≤0,05 (двуфакторный дисперсионный анализ).

Таким образом, установлено, что конвульсивный электрошок у мышей в основном воздействует на стриатарную и гипоталамическую дофаминергическую систему. ГИЖ-332 не противодействует усилению функциональной активности дофаминергической системы в гипоталамусе и в стриатуме, вызванной МЭШ, но снижает оборот дофамина во фронтальной коре.

Заключение

Таким образом, установлены компоненты механизма реализации противосудорожного действия ГИЖ-298 и ГИЖ-290.

В условиях МЭШ-индуцированных судорог установлено, что противосудорожные эффекты ГИЖ-298 сопровождаются восстановлением количества D2-рецепторов на мембранах стриатума, внутри- и вне-клеточного оборота дофамина, уровня норадреналина в стриатуме (как у топирамата), а также восстановлением нарушенного баланса ГАМК/глутамат (как у вальпроевой кислоты) и содержания тормозных аминокислот (таурина, глицина и ГАМК) в гипоталамусе. ГИЖ-298, как и вальпроевая кислота, препятствует МЭШ-индуцированному увеличению активности протеинкиназы ERK1/2 и синапсина I в стриатуме мышей. По выраженности эффекта соединение ГИЖ-298 не уступает вальпроевой кислоте. ГИЖ-298, в отличие от вальпроевой кислоты является прямым (умеренным по сравнению с блокатором MEK киназ - U0126) ингибитором звеньев ERK1/2-каскада, так как подавляет фосфорилирование фермента в клетках нейробластомы в концентрациях, близких к терапевтическим.

Выявлены различия в нейрорецепторных эффектах ГИЖ-290 и леветирацетама в условиях модели литий-пилокарпиновых судорог. Определена вовлеченность $ГАМК_B$-рецепторов в механизм противосудорожного действия ГИЖ-290, а $ГАМК_A$-рецепторов в противосудорожный эффект леветирацетама. Различия в нейромедиаторных эффектах леветирацетама и ГИЖ-290 в условиях модели наблюдаются во влиянии ГИЖ-290 на уровни таурина во фронтальной коре.

Нейрохимическое исследование соединения показало, что ГИЖ-332 снижает внутриклеточный оборот дофамина во фронтальной коре.

Полученные результаты опубликованы в работах с соавторами:

Литвинова С.А. Изучение электрофизиологических и нейрохимических механизмов противосудорожных эффектов нового оригинального соединения ГИЖ298 [Текст] / ***Литвинова С.А.,*** *Воронина Т.А., Кудрин В.С., Гайдуков И.О., Неробкова Л.Н., Писклова М.В.,*

Авакян Г.Г., Жмуренко Л.А. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2016. – Т. 8, №3. – С. 19-26 [56].

*Литвинова С.А. Изучение влияния производного оксимов пиридина (ГИЖ-298) на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс на фоне судорог, вызванных максимальным электрошоком [Текст] / **Литвинова С.А.,** Наркевич В.Б., Гайдуков И.О., Кудрин В.С., Воронина Т.А. // Журнал НЕЙРОХИМИЯ. -2019, Т. 36. № 3. – С. 239-245 [60].*

*Litvinova. Svetlana A. ERK1/2 kinases and dopamine D2 receptors participate in the anticonvulsant effects of a new derivative of benzoylpyridine oxime and valproic acid [Текст] / **Svetlana A. Litvinova**, Tatyana A. Voronina, Evgeny A. Kondrakhin, Igor O. Gaydukov, Artem I. Davletshin, Ekaterina V. Vasileva, Georgy I. Kovalev, David G. Garbuz. // European Journal of Pharmacology. 2021. 15; 903. P. 174150 [248].*

*Litvinova S. A.Participation of Brain Receptors in the Mechanism of Anticonvulsant Action of the New 4-Benzoylpyridine Oxime Derivative GIZH-298. [Текст] / **Litvinova S. A.,** Kondrakhin E. V., Voronina T. A., Vasil'eva E. V., and Kovalev G. I. // Neurochemical Journal. – 2023. Vol. 17, No. 1, pp. 75–83. [249].*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных результатов исследования оригинальных соединений - производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина (ГИЖ-301, ГИЖ-292, ГИЖ-311, ГИЖ-277, ГИЖ-298, ГИЖ-162, ГИЖ-323), дибензофурана(-нона) (ГИЖ-272, ГИЖ-276, ГИЖ-328, ГИЖ-338, ГИЖ-332, ГИЖ-327, ГИЖ-310, ГИЖ-310А и ГИЖ-333) и 4-фенилпирролидона (ГИЖ-286, ГИЖ-290, ГИЖ-295, ГИЖ-296, ГИЖ-305) выявил особенности спектров их фармакологической активности и механизма действия.

Установлено, что соединения из ряда оксимов 3- и 4-бензоилпиридина имеют высокий противосудорожный эффект в широком диапазоне доз (20-100 мг/кг), сопоставимый с эффектами вальпроевой кислоты и топирамата (для ГИЖ-311) и превосходящий их (для ГИЖ-298, ГИЖ-162, ГИЖ-301, ГИЖ-323). Наибольшим противосудорожным эффектом обладают соединения, имеющие этилморфолиновую (ГИЖ-298) и диметиламиноэтильную группы (ГИЖ-162), которые по активности (дозам) и эффективности превосходят вальпроевую кислоту и топирамат.

Соединения из ряда производных оксима дибензофуранона (ГИЖ-332, ГИЖ-276, ГИЖ-272, ГИЖ-327, ГИЖ-328 и ГИЖ-310А) в широком диапазоне доз (5-100 мг/кг) обладают выраженным противосудорожным действием преимущественно в отношении припадков у мышей, моделируемых МЭШ, устраняя тоническую фазу судорог и защищая животных от гибели. Выраженная противосудорожная активность в обоих тестах (МЭШ и коразол) наблюдается у соединений ГИЖ-332 (5-40 мг/кг), а умеренная - у ГИЖ-276 (20-100 мг/кг) и ГИЖ-272 (20 мг/кг).

Среди производных 4-фенилпирролидона в базисных тестах скрининга (МЭШ и коразол) выраженным противосудорожным эффектом обладает ГИЖ-290 (2,5 - 10 мг/кг) в отличие от своего структурного прототипа леветирацетама, который в данных тестах имеет низкий уровень эффективности. В тесте антагонизма с коразолом достоверный противосудорожный эффект также имеют ГИЖ-295 (2,5 - 10 мг/кг) и ГИЖ-296 (2,5 мг/кг).

На основании данных, полученных в результате скрининга с использованием тестов МЭШ и антагонизма с коразолом, выявлены соединения с высокой противосудорожной активностью: среди производных 3,4-бензоилпиридина - ГИЖ-298, производных дибензофурана(-она) – ГИЖ-272, ГИЖ-332 и производных 4-фенилпирролидона - ГИЖ-290. Лидерные соединения в широком диапазоне доз обладают выраженной противосудорожной активностью в тестах МЭШ и коразоловых судорог и имеют преимущества по активности и эффективности перед ПЭП первой линии: вальпроевой кислотой, топираматом и леветирацетамом.

Исследование острой токсичности показало, что лидерные соединения ГИЖ-298 (0,5-100 мг/кг), ГИЖ-272 (40 – 400 мг/кг), ГИЖ-332 (40 – 400 мг/кг) и ГИЖ-290 (20-300 мг/кг) в широком диапазоне доз не вызывают седации, появления вегетативных реакций и развития неврологического дефицита.

Анализ острой токсичности производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина показал, что наиболее благоприятным профилем безопасности обладает ГИЖ-298, среднесмертельная доза ($ЛД_{50}$) которого составляет 310 (280–321) мг/кг, тогда как для вальпроевой кислоты этот показатель составляет 457 (380-534) мг/кг. Выведенное значение терапевтической широты (терапевтический индекс, ТИ= $ЛД_{50}/ЕД_{50}$) для ГИЖ-298 составляет более 19, тогда как для вальпроевой кислоты не более 3, что позволяет выделить ГИЖ-298 из рядов 3- и 4-бензоилпиридина в качестве соединения-лидера.

Анализ острой токсичности производных оксимов дибензофурана(-нона) позволяет отнести ГИЖ-272 и ГИЖ-332 к нетоксичным соединениям в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76, так как в дозе 1000 мг/кг они не вызывают гибели животных и развития неврологического дефицита, а их ТИ составляет >33.

Производное 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 является малотоксичным соединением и его средне летальная доза (ЛД50) составляет (691,0 мг/кг), что превышает максимально терапевтическую более, чем в 60 раз, тогда как для леветирацетама (ЛД50 – 1200 мг/кг) по оценкам в разных тестах этот показатель колеблется между 2 и 12 раз.

Таким образом, выявленные лидерные соединения имеют низкую токсичность и выгодно отличаются большой терапевтической широтой, превосходящей в несколько раз этот показатель для вальпроевой кислоты, топирамата и леветирацетама.

В настоящее время энцефалография (ЭЭГ) является незаменимым методом в диагностике эпилепсии. Использование модели хронической очаговой эпилепсии, индуцированной нанесением кобальта на сенсомоторную зону коры, моделирующей первично и вторично-генерализованные судороги, позволило изучить влияние соединений на Эпи систему животных в начальной (1я) и стабильной (2я) стадиях ее развития. Впервые кобальтовая модель эпилепсии была смоделирована на кошках и описана в 1952 году Bonvallet [110]. Затем аппликацию кобальта стали использовать для моделирования эпилепсии на грызунах [230, 283]. Одними из первых в нашей стране исследовали электроактивность кобальтового коркового и амигдалярного очага у крыс и кроликов Э.С.Толмасская (1980 г.) [79] и С.А. Чепурнов (1981 г.) [82]. В новой форме моделирование кобальтового очага в коре на крысах разработано Т.А.Ворониной и Л.Н. Неробковой [69] и включено в руководство по проведению доклинических исследований противосудорожных средств [6]. Преимуществом этого метода является, то, что очаг, создаваемый кобальтом, является адекватной моделью для

изучения кортикальных и подкорковых очагов ЭпА у человека. В условиях этой модели стадийное развитие эпилептической системы сопровождается формированием вторичных, третичных и «зеркальных» очагов Эпи активности, которые синхронизируясь образуют сложную патологическую структурно-функциональную систему. В процессе «эпилептизации» ткани мозга под влиянием кобальта избирательно повреждаются ГАМК-ергические тормозные нейроны и их терминалии [158], появляется гипервозбудимость и нарушение ГАМКергического торможения в поле СА3 гиппокампа [194], подавляется синтез ГАМК и фермента катализирующего преобразование глутамата в ГАМК [138], нарушается поглощение глутамата [259] и модифицируется проницаемость NMDA рецепторов для ионов кальция (Ca2+). Кроме того, наночастицы кобальта (Co NPs) и соли кобальта (Co) повышают уровень внутриклеточного кальция, перекисное окисление липидов, истощение глутатиона [189]. Электрографическое исследование (ЭЭГ) показало, что биоэлектрическая активность головного мозга крыс с кобальт-индуцированным очагом характеризуется высокой разрядной активностью, преобладающей по числу разрядов в детерминатных и доминантных структурах мозга – на стороне аппликации кобальта (в ипсилатеральной коре) и гиппокампе на 1 стадии и в контрлатеральной коре и гипоталамусе на 2-й стадии развития. Эпи системы. Соединение ГИЖ-298 (60 мг/кг) уменьшает (в 5 и более раз) число как первично-, так и вторично генерализованных судорожных разрядов и их длительность в ипси- и контрлатеральной коре, в гиппокампе и гипоталамусе. ВК в дозе 200 мг/кг оказывает выраженное противосудорожное действие наиболее заметное (в 3,4 раза) в электрограммах ипси- и контрлатеральной коры и гипоталамуса. Таким образом, ГИЖ-298 по активности и выраженности эффекта превосходит ВК, что позволяет соединению в меньшей дозе и более эффективно подавлять очаги ЭпА, как в корковых, так и подкорковых структурах мозга на разных стадиях развития Эпи системы.

Проявления судорожных приступов зависят от локализации Эпи очага и от особенностей организации Эпи системы пациента. В связи с этим изучение структуры-мишени действия ПЭП способствует оптимизации лечения эпилепсии и позволяет индивидуально подойти к лечению больных при различных формах эпилепсии. В хронической модели эпилепсии установлено, что на стадии формирования Эпи системы структурными мишенями действия ГИЖ-298 являются очаги ЭпА в ипсилатеральной сенсомоторной коре и гипоталамусе, а на стадии стабилизации Эпи системы эффект соединения направлен на доминирующие очаги Эпи активности в контрлатеральной сенсомоторной коре, гиппокампе и гипоталамусе. Для вальпроевой кислоты в качестве структуры-мишени выступают ипсилатеральная кора и гипоталамус как на 1й, так и 2й стадии развития Эпи системы.

Исследование производного 4-фенилпирролидона соединения ГИЖ-290 на модели хронической фокальной (парциальной) эпилепсии, индуцированной аппликацией кобальта,

показало, что ГИЖ-290 (5 мг/кг) уменьшает число разрядов и их длительность в гиппокампе на 2й, стабильной стадии развития Эпи системы и не влияет на очаги ЭпА сформированные в начальной стадии. Структурный аналог леветирацетам в дозе 200 мг/кг снижает выраженность ЭпА, аналогично ГИЖ-290, только на 2й стабильной стадии развития Эпи системы в корковых структурах и особенно в гиппокампе. При увеличении дозы (до 500 мг/кг) препарат приводит к аггравации пароксизмальной активности, что также наблюдается у некоторых больных эпилепсией [81, 343]. Подобно ГИЖ-290, леветирацетам оказывает влияние на «эпилептизированную» ткань мозга (на 2й стадии развития Эпи системы), что согласуется с экспериментальными и клиническими данными об избирательности действия леветирацетама на ткань мозга, в которой $ГАМК_А$-рецепторы аномально ингибированы аллостерическим модулятором цинком (Zn2+), например в гиппокампе при прорастании мшистых волокон во время эпилептизации. При этом леветирацетам не влияет на $ГАМК_А$-рецепторы в условиях нормы [137]. Известно, что препарат связывается с везикулярным белком (SV2A) и регулирует высвобождение нейромедиаторов. Между сродством к SV2A белку и судорогами выявлена тесная взаимосвязь на разных экспериментальных моделях эпилепсии. У животных, нокаутированных по SV2A белку, развиваются спонтанные судороги и наблюдается ранняя гибель. Однако этот механизм леветирацетама проявляется только при его хроническом введении. Таким образом, установлено, что структурными мишенями противосудорожного действия ГИЖ-290 и леветирацетама являются очаги ЭпА в гиппокампе, сформированные в стабильной стадии развития Эпи системы.

ГИЖ-290 в модели первично-генерализованных судорог, вызванных бемегридом, анатагонистом барбитурового сайта ГАМК-А рецепторов в дозе 5 мг/кг значительно снижает число Эпи разрядов в коре и умеренно в гиппокампе. Леветирацетам (200 мг/кг) не оказывает влияния на ЭпА, вызванную бемегридом, что согласуется с данными литературы об отсутствии прямого эффекта препарата на токи ГАМК-А рецепторов в культурах нейронных клеток, а также в срезах мозга крыс [298]. Полученные результаты на бемегридовой модели судорог, в совокупности с выявленными эффектами в тесте анатагонизма с коразолом, предполагают у ГИЖ-290 воздействие на функциональную активность ГАМК-ергической системы [43].

В модели хронической кобальтовой эпилепсии ГИЖ-332 (производное дибензофуранона) в дозе 10 мг/кг оказывает наиболее выраженный противосудорожный эффект на 2й стадии развития Эпи системы в кортикограммах - в ипси- и контрлатеральной коре. Соединение ГИЖ-272 (производное дибензофуранона) в дозе 40 мг/кг оказывает противосудорожный эффект на очаги ЭпА в гипоталамусе и гиппокампе на 1й стадии развития Эпи системы, и в гиппокампе на 2й стадии формирования очагов ЭпА. Таким образом,

структурными мишенями противосудорожного действия соединения ГИЖ-332 являются ипси- и контрлатеральная кора, а для ГИЖ-272 - гиппокамп и гипоталамус.

В модели генетически детерминированной аудиогенной эпилепсии показано, что лидерные соединения ГИЖ-298 (60 мг/кг), ГИЖ-272 (35 мг/кг), а также леветирацетам (200 мг/кг) и вальпроевая кислота (200 мг/кг) устраняют судороги, вызванные аудиогенным раздражителем у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ), тогда как соединение ГИЖ-332 (40 мг/кг) не защищает от их развития. Известно, что в развитии судорожного припадка у крыс КМ ключевыми являются структуры ствола мозга, главные из которых - ядра верхнего (SC) и нижнего (IC) четверохолмия (corpora quadrigemina), [76, 170]. Неэффективность ГИЖ-332 в отношении судорог крыс КМ может быть обусловлено тем, что ЭпА у этой линии животных не распространяется выше среднего мозга [71], а преимущественной структурой воздействия для ГИЖ-332 является кора. По выраженности противосудорожного эффекта на крысах КМ соединения располагаются в следующей последовательности: ГИЖ-298 = вальпроевая кислота > леветирацетам > ГИЖ-272. По активности ГИЖ-298 и ГИЖ-272 превосходят леветирацетам и вальпроевую кислоту.

Одним из самых тяжелых проявлений эпилепсии, с высоким риском летальности, является эпилептический (Эпи) статус. На сегодняшний день препаратом выбора лечения Эпи статуса являются вальпроаты. Однако лечение вальпроатами далеко не всегда сопряжено с купированием приступа и требует назначение больших доз бензодиазепинов или наркозных средств, например пропофола. В наших исследованиях развитие Эпи статуса вызывали с помощью введения нейротоксина тиолактона гомоцистеина (ГМЦ) в дозе 5,5 ммоль/кг у животных с кобальт-индуцированным очагом в стабильной стадии развития Эпи системы [361]. Нейротоксин ГМЦ провоцирует появление высокоамплитудных продолжительных пик-волновых разрядов, синхронизированных по всем структурам мозга. Электрографический ГМЦ-индуцированный Эпи статус сопровождается развитием моторно-поведенческих судорожных реакций – вторично генерализованных тонико-клонических судорог (ВГТКС), которые в 70% случаев заканчиваются гибелью. ГМЦ сегодня называют «холестерином» 21 века. Этот токсичный метаболит гомоцистеина, находящийся в цепи продуктов метаболизма метионина, возрастает в мозге у пациентов с эпилепсией в силу различных причин, в числе которых нарушение метаболизма цистеина в связи с дефицитом фолиевой кислоты и витамина B12, и в результате окислительного стресса. Гомоцистеин и его производные структурно похожи на глютамин и оказывают прямое возбуждающее действие на NMDA-рецепторы, могут регулировать активность различных метаботропных рецепторов глутамата (mGluR) и вызывают судороги у подопытных животных [334]. Соединение ГИЖ-298 (60 мг/кг) через 50 минут после введения полностью устраняет ЭЭГ и моторные проявления Эпи статуса,

индуцированные ГМЦ, а также гибель животных. В условиях Эпи статуса ГИЖ-298 превосходит по активности и эффективности ВК (200 мг/кг). При использовании ВК эффект развивается только через 3 часа и остаются животные с моторными нарушениями, а также в 30% случаев регистрируется гибель животных. Леветирацетам не оказывает влияния на проявления развернутого Эпи статуса, вызванного ГМЦ [59]

Пилокарпиновая модель воспроизводит гистопатологические данные, наблюдаемые при височной эпилепсии человека, то есть потерю нейронов гиппокампа и прорастание мшистых волокон в зубчатой извилине, при этом ГАМК-А рецепторы мшистых волокон становятся более чувствительные к аллостерическому ингибированию Zn2+, и определена, как специфичная модель для оценки противосудорожного эффекта леветирацетама [282]. Леветирацетам (600 мг/кг) значительно задерживает появление первых судорожных реакций и развитие эпилептического пилокарпинового статуса, а также способствует выживанию животных. На модели литий-пилокарпинового статуса, модели более жесткой и моделирующей рефрактерный статус (так как литий вызывает более сильное возбуждение нейронов) леветирацетам значительно увеличивает выживание животных, что согласуются с данными литературы. Исследование соединения ГИЖ-290 в модели пилокарпинового и литий-пилокарпинового статуса показало, что соединение в дозах 2,5 -10 мг/кг полностью защищает от гибели животных. По выраженности противосудорожного эффекта ГИЖ-290 и леветирацетам имеют сходный профиль, однако леветирацетам уступает соединению ГИЖ-290 по активности.

Таким образом, леветирацетам и вальпроевая кислота эффективно устраняют проявления эпилептического статуса, но имеют разный механизм действия. Леветирацетам эффективен на модели пилокарпинового статуса, где лидирующий очаг ЭпА находиться в гиппокампе, а эффект вальпроевой кислоты проявляется на модели ГМЦ статуса, где лидирующей структурой ЭпА является гипоталамус. По аналогии с препаратами сравнения ГИЖ-290, соединение оказывающие преимущественное воздействие на гиппокамп, эффективен в пилокарпиновой модели Эпи статуса, тогда как ГИЖ-298, оказывающий ингибирующее влияние преимущественно на кору и гипоталамус, устраняет проявления ГМЦ Эпи статуса и не влияет на ЭпА, вызванную пилокарпином. При этом соединение ГИЖ-298 превосходит по активности и эффективности вальпроевую кислоту, а соединение ГИЖ-290 аналогично леветирацетаму по эффективности, но многократно превосходит его по активности.

Эпилепсия, независимо от этиологии (наследственная, приобретенная), часто сопровождается когнитивными и психическими расстройствами - депрессией, тревогой, агрессией, нарушением внимания и памяти [240]. Развитие коморбидных психических и когнитивных нарушений у больных эпилепсией зависит от многих причин, в том числе расположения в мозге эпилептического очага [94], типа ПЭП и продолжительности их

применения [94, 216]. Одной из задач исследования было выявить влияние лидерных соединений на тревогу, депрессивно-подобное поведение животных, а также влияние на когнитивные функции, так как, зачастую, применение ПЭП усугубляет психоэмоциональные расстройства в структуре заболевания.

В тесте оценки психоэмоционального поведения животных (приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ)) ГИЖ-298 (20-60 мг/кг), также как и вальпроевая кислота, оказывает дозозависимый анксиолитический эффект. Анксиолитический эффект вальпроевой кислоты подтверждается у пациентов с эпилепсией и на различных экспериментальных моделях тревожных состояний, в том числе и в тесте ПКЛ [138]. Соединение ГИЖ-290 (10 мг/кг) и препарат сравнения леветирацетам (200 мг/кг) в условиях теста ПКЛ не оказывают влияние на эмоциональное состояние животных. Исследование влияния соединения ГИЖ-298 на депрессивно-подобное поведение мышей в тестах вынужденного плавания по Порсолту и подвешивания за хвост свидетельствуют об отсутствии у него антидепрессивной активности.

Исследование влияния соединений на когнитивные функции показало, что ГИЖ-298 (40 и 60 мг/кг) не вызывает нарушений кратковременной рабочей памяти при однократном и курсовом введениях (14 дней), регистрируемых в тесте Y-образного лабиринта по числу правильного чередования лабиринта. Не оказывает влияние на когнитивные функции мышей в данном тесте и соединение ГИЖ-290 (10 мг/кг/однократно). Однако леветирацетам (200 мг/кг/однократно) умеренно снижает количество правильных чередований рукавов лабиринта и общую двигательную активность, что возможно, вызвано седативным эффектом. Леветирацетам в дозе 600 мг/кг не влияет на кратковременную рабочую память (обучаемость), но облегчает воспроизведение памятного следа в тесте водного лабиринта Морриса. Соединение ГИЖ-290 в отличие от леветирацетама улучшает как обучаемость, так и воспроизведение навыка, не уступая в этом ноотропу пирацетаму. Таким образом, ГИЖ-290 обладает отчетливой ноотропной активностью. По выраженности ноотропного эффекта соединение не уступает пирацетаму и превосходит леветирацетам, а по активности многократно превосходит оба препарата.

Одной из ведущих причин увеличения доли больных эпилепсией являются сосудистые заболевания. Гибель нейронов головного мозга в результате церебральных повреждений, таких как черепно-мозговая травма (ЧМТ), ишемия, инсульт могут проявляться тяжело отсроченными последствиями, приводя к нарушению памяти и обучения, когнитивных функций, развитию хронической эпилепсии. Первичный очаг повреждения при инсульте и ЧМТ включают в себя острую клеточную гибель, нарушение ГЭБ (гематоэнцефалический барьер), что приводят к деполяризации нейронов, выбросу возбуждающих нейромедиаторов и повышению экстраклеточной концентрации К+, а в конечном итоге к гиперсинхронизации нейронов, что

проявляется острыми судорожными приступами [279, 254]. Вторичное повреждение связано с активацией процессов дистантной и вторичной гибели нейронов, активации глии в гиппокампе [293], в первую очередь ГАМК-ергических вставочных нейронов хилуса (зубчатой фасции гиппокампа) [294], нейровоспаления, глио- и ангиогенеза. В хроническом периоде инсульта синтезируемые иммунными клетками цитокины модифицируют функцию глутамат- и ГАМК-ергических рецепторов, ингибируют захват глутамата астроцитами, нарушают функцию потенциал-зависимых ионных каналов, что формирует основу для нейронной гиперсинхронизации [226]. Применение ПЭП, таких как вальпроаты, бензодиазепины, карбамазепин, топирамат и др. купирует повышенную судорожную активность головного мозга, тем самым предотвращая гибель нейронов от судорог, но, как правило, не обладают прямым нейропротекторным эффектом. Кроме того, предотвращение гибели нейронов вследствие судорог препаратами, как это было показано для вальпроатов и топирамата, не оказывает влияния на дальнейшее развитие эпилепсии [113, 306]. Поэтому применение сочетающих противосудорожные и нейропротективные свойства препаратов оправдано не только для устранения судорожной симптоматики, но и для замедления прогрессирования неврологических последствий.

Установлено, что выраженным защитным эффектом на модели ишемического повреждения обладает соединение ГИЖ-272 (10 мг/кг, однократно и курс 7 дней), которое увеличивает количество выживших крыс на 33% по сравнению с контрольными значениями группы с ишемией. ГИЖ-272 ослабляет неврологические и моторные нарушения и восстанавливает когнитивные функции. [62]. Препарат сравнения леветирацетам (100 мг/кг /7дней) не защищает животных от гибели и не способствует устранению неврологических, моторных и когнитивных расстройств. На срезах гиппокампа и коры больших полушарий установлено нейропротективное действие ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней), которое проявлялется в защите от гибели нейронов коры и гиппокампа (особенно в зубчатой фасции) и устранении дезорганизации нейрональных слоев коры.

Инфаркт мозга всегда характеризуется снижением мозгового кровотока (МК). Для исследования МК строят перфузионные карты, с использованием параметров скорости, времени и объема прохождения крови по выбранному ишемизированному участку и на их основе строят прогностические кривые «судьбы» мозгового вещества в зоне гипоперфузии. Длительное снижение перфузионного давления при ишемии вызывает срыв механизмов ауторегуляции, сопровождаемое повреждением эндотелия, уменьшением выброса эндогенных вазодилататоров (оксида азота и простациклина) и одновременно увеличением выработки вазоконстриктора эндотелина-1. Эти события приводят к повышению тонуса сосудов мозга и ухудшают кровоток в области инфаркта и коллатеральных сосудов, тем самым усиливая

ишемическое повреждение [211, 305]. Выявлена четкая корреляция между степенью снижения МК и неврологическим дефицитом. ГИЖ-272 (60 мг/кг, в/в) при однократном введении обладает цереброваскулярными свойствами сопоставимые по «силе» с мексидолом, вызывая увеличение локального мозгового кровотока на 65 % через 30 минут после введения у крыс, перенесших глобальную преходящую ишемию [47]. Кроме того, в дозе 60 мг/кг, оказывающей цереброваскулярные эффекты, выявлены противогипоксические свойства ГИЖ-272 при его однократном (в/б) введении. Эффекты соединения проявляются в условиях острой модели гипоксии, опосредованной образованием метгемоглобина и сниженной способности гемоглобина эритроцитов связывать, транспортировать и отдавать кислород.

ГИЖ-272 (10 мг/кг/7 дней) обладает защитным эффектом на модели интрацеребральной посттравматической гематомы и способствует выживанию животных и ослаблению неврологического и моторного дефицитов, полностью устраняя развитие тяжелых неврологических последствий. ГИЖ-272 устраняет когнитивные нарушения, выявленные на 6 день моделирования патологии в условиях Y-образного лабиринта, увеличивая мотивацию животных к исследованию.

Таким образом, ГИЖ-272 обладает нейропротективным, цереброваскулярным и противоишемическим эффектами на моделях церебральных повреждений мозга по ишемическому (глобальная ишемия) и геморрагическому типу (посттравматическая гематома), защищая от гибели нейронов и организма в целом и уменьшая выраженность неврологического, моторного и когнитивного дефицитов. Леветирацетам не обладает защитным эффектом в модели глобальной ишемии и геморрагического инсульта. Полученные результаты являются основой для изучения ГИЖ-272 в качестве средства лечения постинсультной эпилепсии.

Постинсультные изменения, такие как критическое снижение МК, низкий метаболизм кислорода и повышеная проницаемость ГЭБ усиливают чувствительность мозга к судорогам. В областях повреждения нейронные сети претерпевают анатомические и физиологические изменения, что предрасполагает их к синхронизации и гипервозбудимости, и является причиной судорог в поздний период ишемии [102, 223]. С другой стороны, появившаяся постишемическая судорожная активность значительно увеличивает размер поражения и нарушает восстановление после инсульта [376]. На модели глобальной ишемии установлено появление пароксизмальной активности в ранние (2-7 сутки) и поздние (с 28-х суток) периоды ишемии, при этом лидирующей структурой по числу пароксизмальных разрядов на ранних сроках ишемии является кора, а на поздних - гипоталамус. Время появления пароксизмальной активности в постишемический период у крыс совпадает с клиническими данными [102, 223]. В клинике ранние приступы имеют тесную временную связь с метаболическими нарушениями, развившимися в первые 7 суток после ишемии или кровоизлияния. Поздние припадки

возникают после 2 недель острого нарушения мозгового кровообращения и не имеют тесной связи с системными нарушениями или повреждением мозга [21, 102, 223]. ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) снижает раннюю пароксизмальную активность во всех исследуемых структурах мозга (стриатум, кора, гипоталамус, гиппокамп) на 2 и 7 сутки регистрации. Препарат сравнения леветирацетам (100 мг/кг/7дней) подавляет число и длительность пароксизмов во всех исследуемых структурах на 2 сутки ишемии, тогда как на 7 сутки эффект сохраняется только в гиппокампе. Соединение ГИЖ-272 не влияет на позднюю пароксизмальную активность, появляющуюся на 28 сутки ишемии, что, возможно, обусловлено недостаточной длительностью введения. Леветирацетам, напротив, увеличивает число разрядов в стриатуме на 21 и 28 сутки ишемии, не влияя на пароксизмальную активность в других структурах.

Уменьшение МК при ишемии, а также прогрессирование повреждения тканей оказывают непосредственное пространственно-временное влияние на мощность спектральных ритмов биоэлектрической активности мозга, что свидетельствует о сопряженности биоэлектрической активности с МК в острый период ишемии [162, 280]. Спектральный анализ ЭЭГ крыс после моделирования глобальной ишемии показал значительное замедление ритмов мозга, регистрируемое по увеличению представленности (%) дельта волн (1-4 Гц) с наибольшей выраженностью в гипоталамусе и гиппокампе и снижению тета-активности (4-8 Гц) во всех исследуемых структурах мозга. Полученные результаты совпадают с современными представлениями о взаимосвязи роста дельта активности в 1-е сутки инсульта и неблагоприятными последствиями, обусловленными снижением МК и отеком мозга [162, 213]. Животные с выявленным замедлением ритма мозга не выживали и погибали в период от 2 до 10 дней. И, напротив, животные, у которых не регистрируется рост мощности дельта и падение тета волн в 1 сутки ишеми, выживали. ГИЖ-272 (10 мг/кг/7дней) препятствует повышению дельта активности в 1 сутки ишемии и снижению тета волн во всех структурах мозга. Эти результаты согласуются с выявленными цереброваскулярными свойствами ГИЖ-272, проявляющиеся в способности увеличивать МК в острый период ишемии. Леветирацетам (100 мг/кг/7 дней) в 1 сутки после моделирования ишемии защищает от нарушений распределения дельта и тета волн в стриатуме, коре и гипоталамусе.

Дельта волны при ишемическом повреждении являются чувствительным показателем не только нейрональной дисфункции и объема поражения в острый период ишемии, но и нейрональной пластичности в отставленный период ишемии [90]. В динамике постинсультных изменений (со 2-х суток ишемии) у крыс, не переживших ишемию, наблюдается прогрессирующее снижение дельта волн и тета активности (особенно 7-8 Гц). У выживших животных дельта- и тета-активность в ранний (2-7 сутки) постишемический период не снижалась, а в поздний период (21 и 28 сутки) дельта ритмы усиливались. Динамика роста

дельта активности у выживших крыс контрольной группы, выявленная нами с 21 суток постишемического периода, в свете современных представлений, рассматривается как маркер нейрональной пластичности, а именно прорастания аксонов [131]. ГИЖ-272 способствует нормализации пространственно-временных характеристик мощности и распределения биоритмов мозга во всех исследованных структурах мозга в постишемический период. При этом восстановление всех частот наблюдается со 2 суток ишемии. Леветирацетам (100 мг/кг/7дней) увеличивает дельта активность на 7 и 28 сутки регистрации, однако тета частоты (особенно 7-8 Гц) восстанавливаются только к 21 суткам ишемии.

Одним из путей индукции эпилептогенеза является чрезмерная активация ионотропных глутаматных рецепторов (NMDA и AMPA) во время и после эпилептического припадка. Количественные и качественные перестройки ионотропных и метаботропных глутаматных рецепторов приводят к повышению интенсивности глутаматергической сигнализации, делая ткани мозга более возбудимыми. Баланс NMDA и mGluII рецепторов в центральной нервной системе обеспечивает платформу как для пресинаптического контроля высвобождения глутамата, так и для постсинаптического контроля нейронных ответов на глутамат [108, 151]. Установлено, что в мозге крыс, после тонико-клонических судорог, вызванных однократным корнеальным воздействием максимального электрошока (МЭШ), наблюдается увеличение плотности (Bmax) NMDA-рецепторов в гиппокампе и снижение количества mGluII-рецепторов ($mGluR_{2/3}$) во фронтальной коре. ГИЖ-298 (60 мг/кг/однократно) не противодействует, вызванному МЭШ, количественному изменению глутаматных рецепторов и не влияет на них в условиях нормы без МЭШ.

Избыточная активность глутаматергической системы контролируется также дофаминовыми рецепторами при активации D2/D3 зависимого пути посредством модуляции митогенактивированных киназ (ERK1/2) [112, 178, 207]. В тестах на мышах субхроническое (5 дней) корнеальное воздействие МЭШ снижает плотность D2-рецепторов в стриатуме и не изменяет данный параметр во фронтальной коре. ГИЖ-298 (60 мг/кг/5 дней) препятствует снижению количества D_2-рецепторов на мембранах стриатума, а также на 13% увеличивает их количество у мышей без МЭШ в той же структуре. Стриатум, лимбическая структура мозга, которая в последнее время рассматривается как ключевая для ГАМК-ергической регуляции судорожной активности [320]. Характер ответа ГАМК-ергических нейронов стриатума определяется балансом дофаминовых рецепторов и находится в тесном взаимодействии с дофаминергической системой черной субстанции (ЧС), основная часть нейронов которой направляет свои аксоны в стриатум, формируя нигростриатный путь, принимающий участие в регуляции широкого спектра поведенческих ответов, в том числе, в формировании эпилептиформной активности [320].

Изучено участие серотониновых 5-НТ2А рецепторов в механизме противосудорожного действия соединения ГИЖ-298. Известно, что экспрессия 5-НТ2А-рецепторов на возбуждающих пирамидных нейронах коры усиливает глутаматергические спонтанные возбуждающие постсинаптические токи (EPSC) [130]. Установлено, что количественные и качественные характеристики связывания 5-НТ2А-рецепторов во фронтальной коре крыс не нарушались после судорог, вызванных МЭШ, и/или после введения ГИЖ-298.

Полученные результаты радиолигандного связывания свидетельствуют о выраженных изменениях функциональной активности NMDA, mGluII и D2 рецепторов в мозге животных, перенесших судороги и вовлечении D2-рецепторов в противосудорожные эффекты ГИЖ-298.

Большой интерес представляет возможность контроля сигнальных путей, приводящих к гиперактивация нейронов, среди которых наибольшее значение имеют протеинкиназы ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase, компонент MAPK-сигнального каскада). ERK1/2 киназы высокочувствительные ферменты, участвующие в нейрональной активности и вовлекаемые в различные формы синаптической пластичности, активируются в различных моделях судорожных расстройств, в том числе у животных с генетической эпилепсией (крысы Крушинского-Молодкиной) [152]. Одним из основных путей активации ERK1/2 киназ является стимуляция D1 рецепторов, а ингибирующее влияние на фермент оказывает стимуляция D2 рецепторов [112]. Вслед за снижением D2 рецепторов МЭШ-индуцированные судороги многократно усиливают активность фермента ERK1/2 и синапсина I в стриатуме мышей, тогда как ГИЖ-298, и вальпроевая кислота, снижают уровни фосфорилирования ERK1/2 и синапсина I. В клетках нейробластомы человека SH-SY5Y установлено ингибирующее влияние ГИЖ-298 на фосфорилирование ERK1/2 киназ в концентрациях, близких к терапевтическим. Вальпроевая кислота не обладает прямым действием на звенья ERK1/2 киназ.

Повышенная функциональная активность дофаминергической системы при инициации судорог рассматривается как компенсаторная реакция, сдерживающая судорожные проявления, поскольку известно, что дофамин (ДА) способен ингибировать возбудимость нейронов, воздействуя на D2-подтипа рецепторы, функционально относящиеся к т.н. антиэпилептической системе [112, 335]. Установлено, что МЭШ-индуцированные судороги вызывает увеличение функциональной активности стриатарной и гипоталамической дофаминергической систем (мезонигростриарный и тубероинфудибулярные пути), проявляющееся в виде усиления скорости метаболизма ДА в стриатуме, прилежащем ядре (ПЯ), гипоталамусе и во фронтальной коре. Увеличение уровня ДА в мезонигростриарной системе подтверждено также на других экспериментальных моделях эпилепсии, в том числе на пилокарпиновой модели эпилепсии и в генетической модели эпилепсии (крысы линии Крушинского-Молодкиной) [78, 135, 182, 341, 367]. В МЭШ-индуцированной модели судорог также установлено ингибирующее влияние

МЭШ на уровни норадреналина в коре и особенно в стриатуме. ГИЖ-298 (60 мг/кг) препятствует увеличению функциональной активности дофаминергической системы в стриатуме и восстанавливает содержание норадреналина в этой же структуре, тогда как топирамат (100 мг/кг) корректирует изменения только содержания норадреналина.

МЭШ-индуцированные судороги вызывают нарушение баланса возбуждающих и тормозных аминокислот, таких как ГАМК и глицин в гипоталамусе, нарушая соотношение ГАМК/глутамат, и снижают уровни таурина и глицина в гиппокампе. ГИЖ-298 восстанавливает нарушенный баланс ГАМК/глутамат и содержание таурина, глицина и ГАМК в гипоталамусе. А вальпроевая кислота в той же структуре восстанавливает уровни ГАМК и соотношение ГАМК/глутамат.

Полученные данные в условиях МЭШ-индуцированных судорог расширяют представления о механизмах реализации противосудорожного действия известных ПЭП (топирамата и вальпроевой кислоты) и действия соединения ГИЖ-298, которое связано со способностью регулировать активность ERK1/2 сигнального пути, благодаря модуляции D2 рецепторов в лимбических структурах и прямым ингибирующим влиянием upstream звеньев ERK1/2-каскада, а также восстанавливать нарушенный баланс тормозных/возбуждающих аминокислот и катехоламинов.

Установлены различия в нейрохимических эффектах леветирацетама и ГИЖ-290 на интактных животных и в модели литий-пилокарпиновых судорог. У интактных животных соединение ГИЖ-290 (5,0 мг/кг), как и леветирацетам (600 мг/кг), приводят к снижению плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе, а также mGlu-рецепторов и $ГАМК_A$-рецепторов во фронтальной коре, тогда как количество $ГАМК_B$-рецепторов под влиянием обоих препаратов возрастает. Различия в нейромедиаторных эффектах леветирацетама и ГИЖ-290 наблюдаются во влиянии на уровни тормозных и возбуждающих аминокислот в гиппокампе - леветирацетам увеличивает концентрации глутамата, глицина и ГАМК, тогда как ГИЖ-290 снижает уровень ГАМК.

В условиях литий-пилокарпиновых судорог, во фронтальной коре происходит снижение плотности $ГАМК_A$-, $ГАМК_B$-, mGluII-рецепторов, а в гиппокампе снижается количество NMDA-рецепторов. ГИЖ-290 восстанавливает места связывания $ГАМК_B$-рецепторов во фронтальной коре, тогда как леветирацетам увеличивает плотность NMDA-рецепторов в гиппокампе и $ГАМК_A$-рецепторов в коре. Полученные результаты позволяют рассматривать рецепторные изменения маркерами противосудорожного действия леветирацетама и ГИЖ-290 в условиях литий-пилокарпиновых судорог, в частности, защитные эффекты леветирацетама опосредуются восстановлением баланса ионотропных NMDA- и $ГАМК_A$-рецепторов, а эффекты ГИЖ-290 - $ГАМК_B$-рецепторов.

Подводя итоги проведенным исследованиям, можно сделать следующие заключения относительно выявленных лидерных соединений.

Производное оксимов 4-бензоилпиридина - соединение ГИЖ-298 уменьшает судорожную активность в начальной и в стабильной стадии развития эпилептической системы. Мозговые структуры-мишени для ГИЖ-298 являются контрлатеральная кора, гиппокамп и гипоталамус. Одним из особенностей ГИЖ-298 является его способность быстро купировать эпилептический статус с полной защитой от гибели животных. По активности, выраженности эффекта и быстроте его наступления ГИЖ-298 превосходит вальпроат и топирамат. Выявлен выраженный дозозависимый анксиолитический эффект. Установлены компоненты механизма противосудорожного действия ГИЖ-298, которые связаны со способностью снижать чрезмерно-активированную функциональную активность дофаминергической системы и активность ERK1/2 киназ в стриатуме, восстанавливать плотность D2-рецепторов и содержание норадреналина в стриатуме, а также баланс тормозных аминокислот (глицин, ГАМК, таурин) в гипоталамусе.

Производное дибензофурана(-нона) - соединение ГИЖ-272 оказывает противосудорожный эффект в хронической очаговой модели эпилепсии приемущественно на 1 стадии развития эпилептической системы и в генетически обусловленной модели эпилепсии. Структурными мишенями действия ГИЖ-272 на модели хронической очаговой эпилепсии являются гиппокамп и гипоталамус, что совпадает с ЭЭГ мишенями, выявленными на модели глобальной ишемии. Особенностью ГИЖ-272 является устранение пароксизмальной активности, вызванной глобальной ишемией мозга. На моделях ишемии и геморрагического инсульта выявлены его нейропротективные свойства и способность защищать животных от гибели и устранять сопутствующие неврологические расстройства.

Производное дибензофурана(-нона) - соединение ГИЖ-332 оказывает наиболее выраженный эффект на 2-й стабильной стадии развития эпилептической системы. Структурными мишенями воздействия для соединения являются ипси- и контрлатеральная кора. Нейрохимическое исследование показало, что ГИЖ-332 снижает внутриклеточный оборот дофамина во фронтальной коре.

Производное 4-фенилпирролидона - соединение ГИЖ-290, как и его структурный аналог леветирацетам, устраняет судорожную активность у крыс с развитой эпилептической системой. Структурной мишенью для ГИЖ-290 и леветирацетама является гиппокамп. Особенностью действия ГИЖ-290 является его способность устранять эпилептические проявления литий-пилокарпинового рефрактерного статуса. По выраженности эффектов и по активности ГИЖ-290 превосходит леветирацетам. ГИЖ-290 обладает ноотропной активностью, более выраженной, чем леветирацетам. Выявлены различия в нейрохимических эффектах ГИЖ-290 и

леветирацетама. В механизм противосудорожного действия ГИЖ-290 вовлекаются $ГАМК_B$-рецепторы, а в противосудорожный эффект леветирацетама - $ГАМК_A$-рецепторы.

Установленные особенности эффектов лидерных соединений: производных оксимов бензоилпиридина (ГИЖ-298), дибензофурана (ГИЖ-272, ГИЖ332) и производных 4-фенилпирролидона (ГИЖ-290) в условиях различных судорожных состояний и коморбидных тревожных и когнитивных расстройств, выявление мишеней-структур мозга для действия соединения и нейрохимического механизма их эффектов позволяет осуществить персонифицированный подход к использованию новых соединений.

Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать для дальнейшего преклинического изучения: соединение ГИЖ-298 в качестве средств лечения симптоматических генерализованных форм эпилепсии с тревожными расстройствами и эпилептического статуса, соединение ГИЖ-290 в качестве средства лечения височных форм эпилепсии с когнитивными нарушениями, соединение ГИЖ-272 в качестве средства лечения постинсультной эпилепсии, эпилептических энцефалопатий и неврологических расстройств после инсульта.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены новые соединения в рядах производных оксимов бензоилпиридинов (ГИЖ-298) и оксима дибензофуранона (ГИЖ-332, ГИЖ-272), а также 4-фенилпирролидона (ГИЖ-290), обладающие противосудорожной активностью, малой токсичностью и имеющие различные нейропсихотропные и нейропротекторные свойства.

2. ГИЖ-298 (оксалат О-2-морфолинэтилоксим 4-бензоилпиридина) в дозах 40-60 мг/кг полностью устраняет ЭЭГ корреляты Эпи активности мозга, как на начальной, так и на развернутой стабильной стадии формирования Эпи системы в хронической кобальтовой модели эпилепсии. В отличие от вальпроевой кислоты ГИЖ-298 в 100% случаев устраняет эпилептический статус, вызванный нейротоксином гомоцистеином, и сочетает противосудорожную активность и анксиолитические свойства.

3. ГИЖ-290 (2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)уксусной кислоты) в дозах 5-10 мг/кг снижает Эпи активность мозга во второй развернутой стадии Эпи системы у крыс с кобальт-индуцированным очагом и защищает от гибели, вызванной пилокарпиновым и литий-пилокарпиновым Эпи статусом в дозах более, чем в 60 раз ниже, чем у леветирацетама. ГИЖ-290 проявляет ноотропнную активность.

4. ГИЖ-332 (О-(2-хлорбензоил) оксим 3,4,6,7,8,9-гексагидродибензо[b,d]фуран-1(2Н)-она) в дозе 10 мг/кг снижает Эпи активность преимущественно на 2 стадии формирования Эпи системы у крыс с хронической очаговой кобальт-индуцированной эпилепсией; в 100% случаев защищает от коразол-индуцированных судорог. ГИЖ-272 (30 мг/кг) устраняет кобальт-индуцированную Эпи активность преимущественно на 1 стадии развития Эпи системы; сочетает антигипоксические и нейропротективные свойства, защищая от гибели и развития когнитивного и неврологического дефицита на моделях ишемического и геморрагического инсульта.

5. Ишемическое повреждение мозга вызывает две волны ЭЭГ проявлений пароксизмальной активности в постинсультный период: раннюю неэпилептическую (2-7 день) и позднюю эпилептическую (28 сутки), сопровождающуюся у животных снижением порогов судорожной готовности мозга. Лидирующей структурой по числу разрядов в раннем периоде является кора, а в позднем – гипоталамус. Спектральные изменения дельта и тета-активности после инсульта отражают тяжесть неврологических расстройств и предсказывают гибель животных.

6. ГИЖ-272 (О-(4-циннамоил) оксим 3,4,6,7,8,9-гексагидродибензо[b,d]фуран-1(2Н)-она) (10 мг/кг/ 7 дней) устраняет постишемическую пароксизмальную активность в течение первых

7 дней после инсульта и нормализует показатели дельта- и тета-активности на протяжении всего периода (1-28 дней). Лидирующими структурами воздействия соединения, выявленными по выраженности подавления пароксизмальной активности, являются гипоталамус и гиппокамп.

7. Установлены ведущие структурные «мишени» действия лидерных соединений по их способности максимально уменьшать число Эпи разрядов и их длительность в структурах мозга животных: для ГИЖ-298 мишенью является контрлатеральная кора, гиппокамп и гипоталамус, для ГИЖ-272 - гипоталамус и гиппокамп, а для ГИЖ-290 – гиппокамп.

8. Установлены компоненты нейрохимического механизма реализации противосудорожного действия лидерных соединений. ГИЖ-290 в гиппокампе в условиях модели литий-пилокарпиновых судорог восстанавливает до нормы плотность (*Bmax*) $ГАМК_B$-рецепторов, а леветирацетам - количество $ГАМК_A$-рецепторов. ГИЖ-298 в модели МЭШ-индуцированных судорог защищает от падения количества D2-подобных рецепторов в стриатуме, от сверхактивности метаболизма дофамина в стриатуме и сверхэкспрессии форфорилированной формы ERK1/2 киназ (MAP-киназы) в стриатуме, а также нормализует баланс тормозных нейромедиаторных кислот в гипоталамусе.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Выявлены новые высокоэффективные соединения в трех рядах химических соединений - производных 4-фенилпирролидона, оксимов 4-бензоилпиридина и дибензофурана(нона). Установлены особенности их спектров противосудорожного действия, психотропной активности и структурные мишени воздействия. Определены перспективы их дальнейшей разработки внедрения для индивидуальной фармакотерапии с учетом особенностей эпилептической системы пациента, воздействия на структуры мозга, генерирующие ЭпА, а также на сопутствующие коморбидные заболевания.

Среди производных оксима бензоилпиридина выявлено соединение ГИЖ-298, которое обладает противоэпилептической активностью на разных моделях эпилепсии, в том числе обладает уникальной способностью полностью устранять проявления эпилептического статуса, и имеет преимущества перед бензодиазепинами и вальпроатами, а также обладает анксиолитическими свойствами (Патент РФ 2643091 С2). Среди производных оксима дибензофуранона выявлено соединение ГИЖ-272, оказывающее выраженное нейропротективное действие и противосудорожное действие (Патент РФ 2744758 С2), установлено корректирующее влияние ГИЖ-272 на ЭЭГ маркеры пароксизмальной активности и нейрональной дисфункции на модели глобальной ишемии. Среди производных 4-фенилпирролидона выявлено соединение ГИЖ-290, которое сочетает противоэпилептическую активность и способность улучшать когнитивные функции и превосходит по активности структурный аналог леветирацетам (Патент РФ 2748419 С2).

Полученные данные являются основой для внедрения оригинальных соединений ГИЖ-298, ГИЖ-290 и ГИЖ-272 в клиническую практику для лечения различных форм эпилепсии: ГИЖ-298 в качестве средства лечения очаговой (фокальной) эпилепсии, эпилептического статуса, в том числе рефрактерного; ГИЖ-290 в качестве средства лечения парциальных судорог, ювенильной миоклонической эпилепсии с нарушением когнитивных функций; ГИЖ-272 для лечения постинсультной эпилепсии, посттравматической эпилепсии, постинсультных и пост-судорожных когнитивных нарушений. ГИЖ-272 сочетает противосудорожные и нейропротективные свойства и поэтому может быть использован не только для устранения судорожной симптоматики, но и для замедления прогрессирования эпилепсии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

б/п	беспородные
в/б	внутрибрюшинно
в/в	внутривенно
ВГТКС	вторично-генерализованные тонико-клонические судороги
ВК	вальпроевая кислота
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ГАМК	γ-аминомасляная кислота
ГВК	гомованилиновая кислота
ГИ	геморрагический инсульт
ГМЦ	гомоцистеина тиолактон
ГПК	гиппокамп
ГПТ	гипоталамус
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДА	дофамин
ДНК	дезоксирибонуклеино-вая кислота
ДОФУК	3,4-диокси(гидрокси)фенилуксусная кислота
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
ИИ	ишемический инсульт
ИК	ипсилатеральная кора
ИПГ	интрацеребральная посттравматическая гематома
КК	контрлатеральная кора
КМ	Крушинского-Молодкиной крысы
$ЛД_{50}$	доза, вызывающая летальный исход у 50 % животных
ЛМК	локальный мозговой кровоток
ЛО	ложнооперированные
ЛП	латентный период
МЭШ	максимальный электрошок
НА	норадреналин
ПИЭ	постинсультная эпилепсия
ПЭП	противоэпилептические препараты

СИОЗ	селективные ингибиторы обратного захвата
$ТД_{50}$	доза, вызывающая неврологический дефицит у 50 % животных
цАМФ	циклический аденозинмонофосфат
МК	мозговой кровоток
ЦНС	центральная нервная система
Физ.р-р	физиологический раствор
$ЭД_{50}$	доза, вызывающая эффект у 50 % животных
ЭпА	эпилептиформная активность
Эпи	эпилептический
ЭС	эпилептический статус
ЭЭГ	электроэнцефалограмма
3-МТ	3-метокситирамин
5-НТ, 5-ОТ	5-гидрокситриптамин
ADK	аденозинкиназа
ANOVA	дисперисонный анализ
BDNF	нейротрофический фактор мозга
BGT-1	натрий и хлорид-зависимый ГАМК-бетаин транспортер 1
CREB	цАМФ-зависимый транскрипционный фактор
D2	Дофаминовые рецепторы 2 типа
DBA/2	линия инбредных мышей
EDTA	этилендиаминтетраацетат
GAERS	генетически предрасположенные к абсансной эпилепсии крысы
HCN	управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы
ILAE	Международная антиэпилептическая лига
KCNQ	неинактивирующиеся натриевые каналы
mGlu	метаботропые рецепторы глутамата
NMDA	N-метил-D-аспартат
SV2A	белок синаптических везикул 2А-типа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян, Г.Н. Коллективная монография эпилепсия [Текст] / Г.Н. Авакян, М.А Акименко., Н.И. Ананьева, А.Д. Аничков, О.Л. Бадалян, С.Н. Базилевич С.Н., Е.Д. Белоусова, В.П. Берснев, С.Г. Бурд, Е.А. Вальдман, Л.И. Вассерман, П.Н. Власов, Т.А. Воронина, К.В. Воронкова, О.Н. Гайкова, А.Б. Гехт, С.А. Громов, В.И. Гузева, А.Ю. Гусев, А.Ю. Ермаков и др. // Санкт-Петербург. — 2010.

2. Буреш, Я. Электрофизиологические методы исследования в биологии [Текст] / Я. Буреш, М. Петрань, Д. Захар // М: Мир. — 1964. — С. 551.

3. Войтенко, Р.М. Медико-социальная экспертиза и реабилитация при эпилепсии [Текст] / Р.М. Войтенко, Л.А. Крицкая // Обзорная информация ЦБНТИ МТ и СР РФ.—2002.— № 16.

4. Воронина, Т. А. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия [Текст] / Т. А. Воронина, Р. У. Островская, Т. Л. Гарибова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть 1, М.: Гриф и К. — 2012. — С. 287.

5. Воронина, Т. А. Роль гипоксии в развитии инсульта и судорожных состояний. Антигипоксанты [Текст] / Т. А. Воронина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2016. — Т. 14, №. 1. — С. 63-70.

6. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств [Текст] / Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Ч. 1. — М.: Гриф и К, 2012. — С. 235-250.

7. Воронина, Т.А. Электрофизиологические механизмы реализации противоэпилептического действия бепродона [Текст] / Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова, Г.Н. Авакян, А.В. Бахуташвили, Г.Г. Авакян, И.Г. Капица, И.О. Гайдуков, И.Г. Ковалев // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2015. — Т.7. — №1. — С. 8-19.

8. Воронина Т.А. Противосудорожное действие производного 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298) на пароксизмальную активность в структурах мозга крыс с кобальт-индуцированной очаговой эпилепсией на первой стадии формирования эпилептической системы [Текст] / Воронина Т.А., Гайдуков И.О., Литвинова С.А., Неробкова Л.Н., Жмуренко Л.А. // Фармакокинетика и фармакодинамика. — 2016. — №2.- С.37-39.

9. Воронина Т.А. Ориентированный поиск противоэпилептических препаратов. Производныек бензоилпиридина и фенилпирролидона – новые классы соединений с

противосудорожной активностью [Текст] / Воронина Т.А., Литвинова С.А., Неробкова Л.Н., Ковалев И.Г, Гайдуков И.О., Авакян Г.Г., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В. // Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». — 2018. — Т. 81., №. 5. — С. 46-47.

10. Воронина Т.А. Возможности фармакологической коррекции нарушений, возникающих при ишемии мозга и пароксизмальных состояниях. Производные дибензофурана [Текст] / Воронина Т.А., Литвинова С.А. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2019. — Т. 17. — №1. С 65-70.

11. 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. 11 - 124.

12. Воронина, Т. А. Изучение действия соединения ГИЖ-290 и леветирацетама на эпилептическую активность в структурах мозга крыс на ЭЭГ модели судорог, вызванных бемегридом [Текст] / Воронина Т.А., С. А. Литвинова, Ковалев И. Г. // Фармакокинетика и фармакодинамика. — 2020. — №4. — С.14-19.

13. Воронина Т.А. Изучение электрофизиологических механизмов противосудорожного действия оригинального аналога леветирацетама – соединения ГИЖ-290 [Текст] / Воронина Т.А., Литвинова С.А., Гладышева Н.А., Яковлева А.А. // Фармакокинетика и фармакодинамика. — 2021. — Т. 1.

14. Воронкова, К.В. Проблемы в лечении пациентов с эпилепсией и их решение [Текст] /К.В. Воронкова, А.С. Петрухин // Эпилепсия — 2015. — №2(17). — С. 2-7.

15. Ганнушкина, И.В. Функциональная ангиоархитектоника головного мозга [Текст] / И.В. Ганнушкина // Медицина, Москва. — 1997. — С. 224.

16. Ганнушкина, И.В. Патофизиологические механизмы нарушений мозгового кровообращения и новые направления в их профилактике и лечении [Текст] / И.В. Ганнушкина // Журнал неврологии и психиатрии. — 1996.—№ 1. — С. 14-18.

17. Гайдуков И.О. Исследование противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298) и вальпроевой кислоты на модели эпилептического статуса у крыс с кобальт-индуцированным очагом [Текст] / Гайдуков И.О., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Авакян Г. Г., Кутепова И.С. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2017. — Т. 9, № 2. — С. 57-66.

18. Гайдуков И.О. Анализ зависимости между химическим строением и противосудорожной активностью в ряду производных 3- и 4-бензоилпиридина [Текст] / И.О. Гайдуков, С.А. Литвинова, Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова, Л.А. Жмуренко, Г.В. Мокров //

Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». — 2018. — Т. 81., №. 5. — С. 50-51.

19. Gaydukov I.O. Anticonvulsant activity of new 3- and 4-benzoilpiridines oxime derivatives in comparison with valproic aci [Текст] / I.O. Gaydukov, T. A Voronina, S. A. Litvinova, I. S. Kutepova. Medicinal Chemistry Research.—2020.—Vol. 29. — № 4. P. 783-792.

20. Гайдуков И.О. Влияние нового производного оксима 4-бензоилпиридина - ГИЖ-298 и вальпроевой кислоты на тревожное и депрессивно-подобное состояния, когнитивные функции в эксперименте [Текст] / Гайдуков И.О., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Гладышева Н.А., Волкова А.В. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2022. — Т.85. — №7. — С. 8-12.

21. Гехт, А.Б. Особенности церебральной гемодинамики у больных с эпилептическими припадками после ишемического инсульта [Текст] / А.Б. Гехт, О.Я. Кураш, А.П. Беликова, А. В. Лебедева, А. А. Кабанов, А. А. Фейгина, И. Л. Каймовский // Журнал неврологии и психиатрии. — 2003. — Т. 9. — С. 28-32.

22. Гехт, А.Б. Эпидемиология эпилепсии в России [Текст] / А.Б. Гехт, Л.Е. Мильчакова, Ю.Ю. Чурилин и соавт. // Журн. неврологии и психиатрии. им. С.С. Корсакова. — 2006. — № 1. — С. 3-7.

23. Глозман И.О., Жмуренко Л.А., Загоревский В.А. и др. [Текст] // Химико-Фармацевтический журнал. — 1987. — №9. — С. 1059 – 1063.

24. Гузева, В.И. Диагностика и коррекция когнитивных нарушений у детей дошкольного возраста с эпилепсией [Текст] / В.И. Гузева, В.В. Гузева, О.В. Гузева и др. // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. — 2015. — №10. — С.51-55.

25. Гузева, В.И. Эпилепсия и неэпилептические пароксизмальные состояния у детей [Текст] / В.И. Гузева // М: МИА. — 2007. — С. 568.

26. Гуляева, Н.В. Стадийность изменений нейропластичности при эпилептогенезе на примере височной эпилепсии [Текст] / Н.В. Гуляева // Журнал неврологии и психиатрии. — 2017. — №9. — С. 2.

27. Гусев, Е.И. Современная эпилептология: проблемы и решения [Текст] / Е.И. Гусев, А.Б. Гехт // М.: ООО «Буки-Веди». — 2015. — С. 520.

28. Гусев, Е.И. Эпидемиология эпилепсии в Российской Федерации [Текст] / Е.И. Гусев, А.Б. Гехт, В.И. Хаузер // Современная эпилептология. Материалы Международной конференции Санкт–Петербург, 23–25 мая 2011. — С. 77-92.

29. Гусев, Е. И. Эпилепсия и ее лечение [Текст] / Е. И. Гусев, Г. Н. Авакян, А. С. Никифоров - Москва : ГЭОТАР-Медиа. — 2014. — 160 с.

30. Жмуренко, Л.А. Синтез и противосудорожная активность производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридинов [Текст] / Л.А. Жмуренко, Т.А. Воронина, С.А. Литвинова, Л.Н. Неробкова, И.О. Гайдуков, Г.В. Мокров, Т.А. Гудашева // Химико-фармацевтический журнал. — 2018. — 52(1). — С. 19-28.

31. Жмуренко Л.А. Синтез, противосудорожная, антигипоксическая и противоишемическая активность производных оксима дибензофуранона [Текст] / Жмуренко Л.А., Литвинова С.А., Кутепова И.С., Неробкова Л.Н., Мокров Г.В., Ребеко А.Г., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. — 2019. — Т. 53, № 11. — С. 9-16.

32. Жмуренко Л.А. Синтез, противосудорожная и ноотропная активность производных 4-фенилпирролидона [Текст] / Жмуренко Л.А., Литвинова С.А., Мокров Г.В., Ковалев И.Г., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Гудашева Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. — 2019. — Т. 53, № 5. — С. 20-27.

33. Зинчук, М.С. Аффективные расстройства у пациентов с эпилепсией [Текст] / М.С. Зинчук // Методические рекомендации, Москва. — 2019.

34. Калинин, В.В. Психиатрические проблемы эпилептологии и психиатрии [Текст] / В.В. Калинин // Социальная и клиническая психиатрия. — 2003. — Т.3. — С. 5-11.

35. Карлов, В.А. Предварительные результаты эффективности генерического леветирацетама (эпитера) в монотерапии у взрослых [Текст] / В.А. Карлов, П.Н, Власов, И.А. Жидкова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. — 2015. — №7 (специальный выпуск 1). — С. 36-40.

36. Карлов, В.А. Эпилепсия и функциональная организация вегетативной нервной системы [Текст] / В.А. Карлов, В.В. Гнездицкий, И.Н. Деряга, М.А. Глейзер // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. — 2013. — №8. — С.4-9.

37. Карлов, В.А. Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин [Текст] / В.А. Карлов // 2-е издание. ed. Москва: ООО "Издательский дом “БИНОМ”. — 2019. — С. 896.

38. Карлов, В.А. Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин [Текст] / В.А. Карлов // Руководство для врачей. — М.: ОАО «Медицина». — 2010. — С. 720.

39. Кваскова, Н.Е. Фокальный эпилептический миоклонус при синдроме Кожевникова–Расмуссена [Текст] / Н.Е. Кваскова, К.Ю. Мухин // Русский журнал детской неврологии. — 2014. — №4. — С. 14-22.

40. Кириченко, А.Г. Социально-эпидемиологические аспекты заболеваемости и первичной инвалидности вследствие неврологических заболеваний (эпилепсии) [Текст] / А.Г. Кириченко // Проблемы экологии и медицины. — 2012 — Т. 16. — № 1-2 – С. 34-37.

41. Клинические рекомендации «Эпилепсия и эпилептический статус у взрослых и детей». Минздрав РФ. — 2020. — Режим доступа: https: // cr.minzdrav.gov.ru/schema/741_6.

42. Ковалев И.Г. Участие глутаматных и ГАМК-рецепторов в противосудорож-ном эффекте леветирацетама и производного 4-фенилпирролидона (ГИЖ-290) у крыс. [Текст] / И.Г. Ковалев, Е.В. Васильева, Е.А. Кондрахин, Т.А. Воронина, Г.И. Ковалёв // Нейрохимия. — 2017. — №4 –С.1-10.

43. Ковалев И.Г. Сравнение противосудорожных и мнемотропных свойств новых производных 4-фенилпирролидона, леветирацетама и пирацетама. [Текст] / И.Г. Ковалев, Т.А. Воронина, С.А. Литвинова, Л.А. Жмуренко, Г.В. Мокров // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2017. — Том 80, № 6. — С.13-18.

44. Коробов, М.В. Справочник по медико-социальной экспертизе и реабилитации [Текст] / М.В. Коробов, В.Г. Помников // СПб.: Издательство «Гиппократ». — 2010.

45. Крицкая, Л.А. Особенности медикосоциальной экспертизы при эпилепсии в настоящее время [Текст] / Л.А. Крицкая, Р.М. Войтенко, В.Г Помников // Сборник научных статей «Медико-социальная экспертиза и реабилитация». Минск. — 2006. — №8. — С. 79-88.

46. Крицкая, Ю.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика эпилепсии в забайкалье [Текст] / Ю.А. Крицкая, Н.А. Шнайдер, Ю.А. Ширшов // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2012. — № 1.—Т.4. — С. 23-28.

47. Курдюмов И.Н. Влияние мексидола и гемисукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на церебральную гемодинамику при геморрагическом ишемическом поражениях мозга [Текст] / Курдюмов И.Н., Ганьшина Т.С., Масленников Д.В., Курза Е.В., Горбунов А.А., Турилова А.И., Мирзоян Р.С. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2019. — Т. 82. № 2. С. 3-6.

48. Кутепова И. С. Исследование порога судорожных проявлений у животных после перенесенного инсульта [Текст] / И. С. Кутепова, С.А. Литвинова, Т.А. Воронина // Сборник тезисов Сеченовского Международного Биомедицинского Саммита. — 2017. — С.73.

49. Кутепова И. С. Исследование противосудорожной активности производных фурана [Текст] / И. С. Кутепова, С.А. Литвинова, Т.А. Воронина, Л.А. Жмуренко, Г.В. Мокров // Экспериментальная и клиническая фармакология. Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». — 2018. — Т. 81. — №. 5s. — С. 137-138.

50. Кутепова И. С. Исследование влияния соединений с противосудорожной активностью на судорожный порог у животных после перенесенного инсульта [Текст] / И. С. Кутепова, С.А. Литвинова, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. Материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». — 2018. — Т. 81, №. 5s. — С. 138.

51. Кутепова И.С. Исследование влияния производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на выживаемость и энцефалографические показатели мозга крыс с ишемическим инсультом [Текст] / И.С. Кутепова, С.А. Литвинова, Л.Н. Неробкова, Т.А. Воронина // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки». — 2018. — С. 67-69.

52. Кутепова И.С. Исследование противоэпилептической активности производных оксима дибензофурана на модели фокальной эпилепсии [Текст] / И.С. Кутепова, С.А. Литвинова, Т.А. Воронина, А.А. Петрунина, Н.А. Гладышева, М.Д. Кондратова, Л.А. Жмуренко // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. — 2019. — Т. 9, №. 7. — С. 275

53. Кутепова И.С. Противосудорожная активность производных дибензофурана в эксперименте [Текст] / Кутепова И.С., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Мокров Г.В., Жмуренко Л.А.. // Экспериментальная и клиническая фармакология. -2019. Т. 82.№ 8. С. 3-8.

54. Кутепова, И. С. Исследование нового производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 на моделях очаговой эпилепсии и интрацеребральной посттравматической гематомы [Текст] / Кутепова, И. С., Литвинова, С. А., Воронина, Т. А., Жмуренко, Л. А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2020. — Т. 83. — №9. С. 3-8.

55. Кутепова И.С. Особенности спектра противосудорожной активности соединения ГИЖ-332 (производное дибензофуранона) в зависимости от локализации доминантного очага [Текст] / Кутепова И.С., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Яковлева А.А., Гладышева Н.А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2021. — Т. 84. — № 10. С. 3-9.

56. Литвинова С.А. Изучение электрофизиологических и нейрохимических механизмов противосудорожных эффектов нового оригинального соединения ГИЖ298 [Текст] / Литвинова С.А., Воронина Т.А., Кудрин В.С., Гайдуков И.О., Неробкова Л.Н., Писклова М.В., Авакян Г.Г., Жмуренко Л.А. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2016. — Т. 8. — №3. — С. 19-26.

57. Литвинова С.А., Нейропротективные свойства производного фурана — соединения ГИЖ-276 на модели геморрагического инсульта [Текст]/ Литвинова С.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А., Кутепова И.С., Жмуренко Л.А. // Фармакокинетика и фармакодинамика. — 2016. — № 3. — С. 31-33.

58. Литвинова С.А. Сравнение эффектов и электрофизиологических механизмов действия вальпроевой кислоты и леветирацетама на экспериментальной модели очаговой эпилепсии [Текст] / Литвинова С.А., Авакян Г.Г., Воронина Т.А., Гайдуков И.О., Неробкова

Л.Н., Кутепова И.С., Авакян Г.Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии.- 2018. — Том 12. — № 3. — С.45-52.

59. Литвинова С.А. Особенности действия леветинола на развитие судорожной активности у крыс с кобальт-индуцированной хронической эпилепсией [Текст] / Литвинова С.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Кутепова И.С., Авакян Г.Г., Авакян Г.Н. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2018. — Т. 10. — № 1. — С. 52 – 62.

60. Литвинова С.А. Изучение влияния производного оксимов пиридина (ГИЖ-298) на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс на фоне судорог, вызванных максимальным электрошоком [Текст] / Литвинова С.А., Наркевич В.Б., Гайдуков И.О., Кудрин В.С., Воронина Т.А. // Журнал НЕЙРОХИМИЯ. — 2019, Т. 36. — № 3. — С. 239-245.

61. Литвинова С.А. Влияние лакосамида на эпилептиформную активность и динамику структурно-функциональных связей эпилептической системы крыс с хронической фокальной эпилепсией [Текст] / Литвинова С.А., Авакян Г.Г., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Гладышева Н.А. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2019. — Т. 11. — №1. С. 37-46.

62. Литвинова, С. А. Противоишемические и цереброваскулярные свойства производного оксима дибензофурана ГИЖ-272 [Текст] / С.А. Литвинова, И.С. Кутепова, Е.В. Курза, М.Д. Кондратова, Т.А. Воронина, Т.С. Ганьшина, Р.С. Мирзоян, Л.А. Жмуренко // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2019. — Т. 82, № 6. — С. 3-7.

63. Магомедова, А. Х. Опыт применения леветирацетама (кеппра) в лечении постинсультной эпилепсии [Текст] / А. Х. Магомедова, М. М. Магомедов, А. М. Магомедова, М. Ф. Магомаев // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. — 2012. — Т. 112, №. 6. — С. 40-44.

64. Макаренко, А.Н. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных [Текст] / А. Н. Макаренко, Н. С. Косицин, Н. В. Пасикова, М. М. Свинов // Журнал высшей нервной деятельности. — 2002. — Т.52, №6. — С.765-768.

65. Маслова Н.Н., Скоробогатова В.А. Комплаенс в эпилептологии: современный взгляд на проблему и стратегии его оптимизации [Текст] / Н.Н. Маслова, В.А. Скоробогатова // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2020. — Т.12, №1. — С. 74-81.

66. Мильчакова, Л.Е. Клинические и фармакоэкономические аспекты эпилепсии [Текст] / Л.Е. Мильчакова // Автореферат. Москва. — 2005.

67. Мирзоян, Р.С. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени [Текст] / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т. С. Ганьшина, А.В. Топчян, Г.А. Чернышева // Руководство по

проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть 1, М.: Гриф и К. — 2012. — С. 482.

68. Макаренко А.Н. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных [Текст] / Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Пасикова Н.В., Свинов М.М. // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. — 2002. — Т. 52. — № 6 С. 765–768.

69. Неробкова Л.Н. Об электрофизиологических и биохимических механизмах противосудорожного действия антиоксиданта из класса 3-оксипирида [Текст] / Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Алиев А.Н., Смирнов Л.Д., Крыжановский Г.Н., Браславский В., Никушкин Е.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1986. Т. 102. № 12. С. 663-665.

70. Петрухин, А.С. Эпилептология детского возраста [Текст] / А.С. Петрухин // М.: Медицина. — 2000.— С. 622.

71. Полетаева, И.И. Генетическая линия крыс Крушинского – Молодкиной как уникальная экспериментальная модель судорожных состояний [Текст] / И. И. Полетаева, З. А. Костына, Н. М. Сурина и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2017.—№21. — С. 427-434.

72. Помников, В.Г. Медико-социальная экспертиза при эпилепсии [Текст] / В.Г. Помников, Л.А. Крицка, Н.Г. Магомедова Н.Г. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2017. — № 2. — С. 95-99.

73. Прокудин, М.Ю. Роль экспрессии глутамин-синтетазы и транспортера цистин/глутамата (SLC7A11, xCT) в патогенезе развития эпилепсии у пациентов с супратенториальными глиомами головного мозга [Текст] / М.Ю. Прокудин, Б.В. Мартынов, А.И. Яковенко, И.В. Литвиненко, В.Ю. Лобзин, Д.В. Свистов, В.С. Чирский, К.А. Чемодакова, О.А. Клиценко // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2022. — Т. 14. — №2. — С. 204-213.

74. Рогачева, Т. А. Закономерности становления и течения ремиссии при эпилепсии [Текст] / Т.А.Рогачева // Психиатрия. — 2006. — № 1. — С.32-38.

75. Савенков, А.А. Применение ноотропов и антиоксидантов в комплексной терапии симптоматической посттравматической эпилепсии [Текст] / А.А. Савенков, О.Л. Бадалян, Г.Н. Авакян // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2013. — Т.113.—№6. — С.26-34.

76. Семиохина А.Ф. Крысы линии Крушинского-Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения [Текст] / А.Ф. Семиохина, И.Б. Федотова, И.И. Полетаева // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. — 2006. — Т. 56 (3). — С. 298-316.

77. Соколова И.В. Травматическая эпилепсия при ЧМТ [Текст] / И.В. Соколова, С.М. Карпов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2012. — №1. — С. 44-55.

78. Сорокин, А.Я. Межлинейные различия в эффектах амфетамина и раклоприда на активность дофаминергической системы в дорзальном стриатуме крыс линии КМ и Вистар (микродиализное исследование) [Текст] / А.Я. Сорокин, В.С. Кудрин, П.М. Клодт, Л. Туомисто, И.И. Полетаева, К.С. Раевский // Генетика. — 2004. — Т.40. — №6. — С. 846-849.

79. Толманская, Э.С. О роли систем подкрепления гипоталамуса в проявлении судорожной активности [Текст] / Э.С. Толмасская, JT.H. Неробкова, В.Ю. Щебланов // Успехи физиол. наук. — 1980. — Т. 11. — №4. — С. 99-114.

80. Узбеков, М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях [Текст] / М.Г. Узбекков // Социальная и клиническая психиатрия. — 2014. — Т. 24. — № 4. — С. 97-103.

81. Холин, А.А. Аггравация эпилепсии при терапии леветирацетамом: наблюдение 28 клинических случаев, факторы риска и профилактика [Текст] / А.А. Холин, И.Д. Федонюк, Л.М. Колпакчи, Е.С. Ильина, К.Ю. Мухин // Российский журнал детской неврологии. — 2014. — №9. — С. 5-22.

82. Чепурнов, С.А. Миндалевидный комплекс мозга [Текст] / С.А. Чепурнов, Н.Е. Чепурнова // М. Изд-во МГУ.—1981. — С.255.

83. 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 — №112(2). — С. 35-39.

84. Adams, B. Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fi ber sprouting, and attenuates seizureiduced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy [Текст] / B. Adams, M. Sazgar, P. Osehobo et al // Journal of Neuroscience. — 1997 — Vol. 17. — № 14. — P. 5288-5296.

85. Aguiar, C.C. Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review [Текст] / C.C. Aguiar, A.B. Almeida, P.V. Araújo, R.N de Abreu, E.M. Chaves, O.C. do Vale, D.S. Macêdo, D.J. Woods, M.M. Fonteles, S.M. Vasconcelos // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2012. — Vol. 17. — P. 795259.

86. Alizadeh Khatir, A. Toxoplasma infection and risk of epilepsy: A case-control study of incident patients [Текст] / A. Alizadeh Khatir, S.A. Moghaddam, M. Almukhtar, H. Ghorbani, A. Babazadeh, S. Mehravar, A. Rostami // Microbial Pathogenesis. — 2021. — Vol. 161. — P. 105302.

87. Alsaadi, T. Prevalence of depression and anxiety among patients with epilepsy attending the epilepsy clinic at Sheikh Khalifa Medical City, UAE: A cross-sectional study [Текст] / T. Alsaadi,

K. El Hammasi, T.M. Shahrour, M. Shakra, L. Turkawi, B. Almaskari, L. Diab, M. Raoof // Epilepsy and Behavior. — 2015. — Vol. 52. — P. 194-199.

88. An, J. J. Altered GABAergic neurotransmission in mice lacking dopamine D2 receptors [Текст] / J. J. An, M.H. Bae, S.R. Cho, S.H. Lee, S.H Choi, B.H Lee, [et al] // Molecular and Cellular Neuroscience. — 2004. — Vol. 25. — P. 732-741.

89. André, V.M. Interneurons, GABAA currents, and subunit composition of the GABAA receptor in type I and type II cortical dysplasia [Текст] / J. J. An, M. H. Bae, S. R. Cho, S. H. Lee, S. H. Choi, B. H Lee, [et al.] // Epilepsia. — 2010. — Vol. 51.3—№ 3. — P. 166-170.

90. Assenza, G. Neuronal functionality assessed by magnetoencephalography is related to oxidative stress system in acute ischemic stroke [Текст] / G. Assenza, F. Zappasodi, R. Squitti // Neuroimage. — 2009. — Vol. 44, №. 4. — P. 1267-1273.

91. Assenza, G. Wakefulness delta waves increase after cortical plasticity induction [Текст] / G. Assenza, G. Pellegrino, M. Tombini // Clinical Neurophysiology. — 2015. — Vol. 126. — №. 6. — P. 1221-1227.

92. Avakyan, G. N. Transformation of the epileptic system. Current status of the problem and possible ways to solve it [Текст] / G. N. Avakyan, G. G. Avakyan // Epilepsy and paroxysmal condition. — 2017. — Vol. 9.—№ 2. — P. 6-19.

93. Aycicek, A.The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children [Текст] / A. Aycicek, A. Iscan // Eur. Neurol. — 2007. — Vol. 57. — № 2. — P. 65-69.

94. Baker, G.A. The associations of psychopathology in epilepsy: a community study [Текст] / G.A. Baker [et al.] // Epilepsy. — 1996. — Vol. 25. — P. 29-39.

95. Bandelow, B. Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: a novel pharmacologic intervention [Текст] / B. Bandelow, D. Wedekind, T. Leon // Expert Rev Neurother. — 2007.—№ 7.—P.769-781.

96. Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R. Serotonin and epilepsy [Текст] / G. Bagdy, V. Kecskemeti, P. Riba, R. Jakus // J Neurochem. — 2007. — Vol. 100. № 4. P. 857-873.

97. Barolin, G. S. Epileptische anfalle bei apoplektikern [Текст] / G. S. Barolin, E. Sherzer // Wein nervenh. — 1962. — Vol. 20. — №. 3. — P. 102.

98. Barros, H.M. Effect of sodium valproate on the open-field behavior of rats [Текст] / H.M. Barros, S.L Tannhauser, M.A Tannhauser, M. Tannhauser // Braz J Med Biol Res. — 1992.— №25.—P.281-287

99. Baulac, M. Rational conversion from antiepileptic polytherapy to monotherapy [Текст] / M. Baulac // Epileptic Disord. — 2003. — Vol. 5. — №3. — P. 125-132.

100. Beaulieu, J.M. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors [Текст] / J.M. Beaulieu, R.R. Gainetdinov // Pharmacol Rev. — 2011 — Vol. 63. — № 1. — P. 182-217.

101. Beaumont, T.L. Advances in the management of subependimal giant cell astrocytoma [Текст] / T.L. Beaumont [et al.] // Childs Nerv Syst. — 2012. — № 28. — P.963-968.

102. Beghi, E. Recommendation for a definition of acute symptomatic seizure [Текст] / E. Beghi, A. Carpio, L. Forsgren // Epilepsia. — 2010. — Vol. 51. — №. 4. — P. 671-675.

103. Beltrán-Sarmiento, E. Effects of Valproate Monotherapy on the Oxidant-Antioxidant Status in Mexican Epileptic Children: A Longitudinal Study [Текст] / E. Beltrán-Sarmiento, C.K. Arregoitia-Sarabia, E. Floriano-Sánchez, [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2018. — P. 7954371.

104. Benbir, G. The epidemiology of post-stroke epilepsy according to stroke subtypes [Текст] / G. Benbir // Acta Neurol Scand. — 2006. — V. 114. — № 1. — P. 8-12.

105. Betjemann, J. P. Status epilepticus in adults [Текст] / J. P. Betjemann, D. H. Lowenstein // Lancet Neurology. — 2015. — Vol. 14. — № 6. — P. 615-624.

106. Biagini, G. Neurosteroids and Epileptogenesis [Текст] / G. Biagini, C. Rustichelli, G. Curia, J. Vinet, C. Lucchi, M. Pugnaghi, S. Meletti // Journal of Neuroendocrinology. — 2013. — Vol. 25. — № 11. — P. 980-990.

107. Blumer, D. Treatment of the interictal psychosis [Текст] / D. Blumer, S. Wakhlu, G. Montouris, A.R. Wyler // J. Clin. Psychiatry. — 2000. — Vol. 61. — P. 2.

108. Bocchio, M. Group II Metabotropic Glutamate Receptors Mediate Presynaptic Inhibition of Excitatory Transmission in Pyramidal Neurons of the Human Cerebral Cortex [Текст] / M. Bocchio, I.P. Lukacs, R. Stacey, P. Plaha, V. Apostolopoulos, L. Livermore, A. Sen, O. Ansorge, M.J. Gillies, P. Somogyi, M. Capogna // Front Cell Neurosci. — 2019 — Vol. 8. — №12.—P. 508.

109. Bolton, P.F. Epilepsy in autism: features and correlates [Текст] / P.F. Bolton, I. Carcani-Rathwell, J. Hutton, S. Goode, P. Howlin, M. Rutter // Br J Psychiatry. — 2011. — Vol. 198. — P. 289-294.

110. Bonvallet, M. Projections olfactives, gustatives, visckrales, vagales, visuelles et auditives au niveau des formations grises du cerveau anterieur du chat [Текст] / M. Bonvallet, P. Dell, A.J. Hugelin // J. Physiol. — 1952.—№ 44. — P. 222-224.

111. Bourgeous, B.F. Antiepileptic drugs, learning and behaviour in childhood epilepsy [Текст] / B.F. Bourgeous, // Epilepsia. — 1998. — Vol. 39. — P. 913-922.

112. Bozzi, Y. The role of dopamine signaling in Epileptogenesis [Текст] / Y. Bozzi, E. Borrelli // Front Cell Neurosci. — 2013. — Vol. 17. — № 7. — P. 157.

113. Brandt, C.Treatment with valproate after status epilepticus: Effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats [Текст] / C. Brandt, A.M Gastens, M. Sun [et al.] // Neuropharmacology. — 2006. — Vol. 51. — № 4. — P. 789-804.

114. Braun, K.P. Preventing cognitive impairment in children with epilepsy [Текст] / Braun, K.P // Curr Opin Neurol.—2017.—№ 30.—P. 140-147.

115. Brown, C. E. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke [Текст] / C. E. Brown, P. Li, J. D. Boyd, K. R. Delaney, T. H. Murphy // Journal of Neuroscience. — 2007. — Vol. 27. — № 15. — P. 4101-4109.

116. Bu, S. Zinc Finger Proteins in Neuro-Related Diseases Progression [Текст] / S. Bu, Y. Lv, Y. Liu, S. Qiao, H. Wang // Front Neurosci. — 2021. — Vol. 18. — № 15. — P. 760567.

117. Burman, J. Epilepsy in multiple sclerosis A nationwide population-based register study [Текст] / J. Burman, J. Zelano // Neurology. — 2017. — Vol. 89. — № 24. — P. 2462-2468.

118. Calabrese, M. Cortical pathology in multiple sclerosis patients with epilepsy: a 3 year longitudinal study [Текст] / M. Calabrese, P. Grossi, A. Favaretto, C. Romualdi, M. Atzori, F. Rinaldi, P. Perini, M. Saladini, P. Gallo // Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. — 2012. — Vol. 83. — P. 49-54.

119. Cantrell A.R., Catterall W.A. Neuromodulation of Na+ channels: an unexpected form of cellular plasticity [Текст] / A.R. Cantrell, W.A. Catterall // Nat Rev Neurosci — 2001 — Vol. 2, № 6. P. 397-407.

120. Cantrell A.R., Tibbs V.C., Yu F.H., Murphy B.J., Sharp E.M., Qu Y., Catterall W.A., Scheuer T. Molecular mechanism of convergent regulation of brain Na channels by protein kinase C and protein kinase A anchored to AKAP-15 [Текст] / A.R. Cantrell., V.C. Tibbs, F.H. Yu, B.J. Murphy, E.M. Sharp, Y. Qu, W.A. Catterall, T. Scheuer // Mol Cell Neurosci — 2002 — Vol. 21. P. 63-80.

121. Cao, Q. CB2R induces a protective response against epileptic seizures through ERK and p38 signaling pathways [Текст] / Q. Cao, F. Yang, H. Wang // Int J Neurosci. — 2021. — Vol. 131. — № 8. — P. 735-744.

122. Cárdenas-Rodríguez, N. Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproic acid, oxcarbazepine, and topiramate): evidence in humans and experimental models [Текст] / N. Cárdenas-Rodríguez, E. Coballase-Urrutia, L. Rivera-Espinosa, A. Romero-Toledo, A. 3rd Sampieri, D. Ortega-Cuellar, H. Montesinos-Correa, E. Floriano-Sánchez, L. Carmona-Aparicio // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2013. — P. 598493.

123. Carmichael, S. T. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves [Текст] / S. T. Carmichael // Annals of Neurology. — 2006. — Vol. 59. — №. 5. P. 735-742

124. Carmichael, S. T. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult [Текст] / S. T. Carmichael, M. F. Chesselet // Journal of Neuroscience. — 2002. — Vol. 22, №. 14. — P. 6062-6070.

125. Chugani D.C. α-methyl-L-tryptophan: mechanisms for tracer localization of epileptogenic brain regions [Текст] / D.C. Chugani // Biomark Med. 2011. — Vol. 5. № 5. P. 567-575.

126. Carver, C.M. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability [Текст] / C.M. Carver, D.S. Reddy // Psychopharmacology (Berl). — 2013. — Vol 230. — № 2. — P. 151-188.

127. Carver, C.M. Zinc Selectively Blocks Neurosteroid-Sensitive Extrasynaptic δGABAA Receptors in the Hippocampus [Текст] / C.M. Carver, S.H. Chuang, D.S. Reddy // J Neurosci. — 2016. — Vol. 36. — № 31. — P. 8070-8077.

128. Cattaneo, D. Association of HIV Infection with Epilepsy and Other Comorbid Conditions [Текст] / D. Cattaneo, A. Giacomelli, D. Minisci, N. Astuti, P. Meraviglia, C. Gervasoni // AIDS Behav. — 2020. — Vol. 24. — № 4. — P. 1051-1055.

129. Caulder, E.H. Activation of group 2 metabotropic glutamate receptors reduces behavioral and electrographic correlates of pilocarpine induced status epilepticus [Текст] / E.H. Caulder, M.A. Riegle, D.W. Godwin // Epilepsy Res. — 2014. — Vol 108. — № 2. — P. 171-181.

130. Celada, P. Serotonin modulation of cortical neurons and networks [Текст] / P. Celada, M. V. Puig, F. Artigas // Frontiers in Integrative Neuroscience. — 2013. — V.7. — P.25.

131. Chadehumbe, M. A. Seizures are common in the acute setting of childhood stroke: a population-based study [Текст] / M. A. Chadehumbe, P. Khatri, J. C. Khoury, K. Alwell, J. P. Szaflarski, J. P. Broderick, D. O. Kleindorfer // Journal of child neurology. — 2009. — Vol. 24. — №. 1. — P. 9-12.

132. Chen, B. Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy [Текст] / B. Chen, H. Choi, L.J. Hirsch, A. Katz, A. Legge, R. Buchsbaum, K. Detyniecki // Epilepsy Behav. — 2017. — Vol. 76. — P. 24-31.

133. Chen, L. Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a μ opioid [Текст] / L. Chen, L.Y. Huang // Neuron. — 1991. — Vol. 7. — P. 319-326.

134. Chen, S. Iron Metabolism and Ferroptosis in Epilepsy [Текст] / S. Chen, Y. Chen, Y. Zhang, X. Kuang, Y. Liu, M. Guo, L. Ma, D. Zhang, Q. Li // Front. Neurosci. — 2020. — Vol. 8. — № 14. — P. 601193.

135. Cifelli, P. Pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy in the rat is associated with increased dopamine neuron activity [Текст] / P. Cifelli, A.A. Grace // Int. J. Neuropsychopharmacol. — 2012. — V. 15. — №7. — P. 957-964.

136. Contreras-García, I.J. Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems [Текст] / I.J. Contreras-García, N. Cárdenas-Rodríguez, A. Romo-Mancillas, C. Bandala, S.R. Zamudio, S. Gómez-Manzo, B. Hernández-Ochoa, J.G. Mendoza-Torreblanca, L.A. Pichardo-Macías // Pharmaceuticals (Basel). — 2022.— №15(4). — P.475.

137. Corbett, R. GABAmimetic agents display anxiolytic-like effects in the social interaction and elevated plusmaze procedures [Текст] / R. Corbett, S. Fielding, M. Cornfelt, R.W. Dunn // Psychopharmacology. — 1991.— №104.— P.312-316.

138. Craig, C.R. GABA receptors, lipids, and gangliosides in cobalt epileptic focus [Текст] / C.R. Craig; B.K. Colasanti // Adv. Neurol. — 1986. — №44. — P. 379-391.

139. Crunelli V, Deidda G, Pierucci M, Di Giovanni G. 5-HT/GABA interaction in neurodevelopment and plasticity [Текст] / V. Crunelli, G. Deidda, M. Pierucci, G. Di Giovanni // Prog Brain Res. — 2021. — Vol. 259. P. 287-317.

140. Curia, G. Phosphorylation of sodium channels mediated by protein kinase-C modulates inhibition by topiramate of tetrodotoxin-sensitive transient sodium current [Текст] / G. Curia, P. Aracri, E. Colombo, P. Scalmani, M. Mantegazza, G. Avanzini, S. Franceschetti // Br J Pharmacol. — 2007. — Vol. 150. — № 6.—P. 792-797.

141. Dalic, L. Managing drug-resistant epilepsy: challenges and solutions [Текст] / L. Dalic, M.J. Cook // Neuropsychiatr Dis Treat. — 2016. — Vol. 12. — № 12. — P. 2605-2616.

142. Dashtipour, K. Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer [Текст] / K. Dashtipour, P. H. Tran, M. M. Okazaki, J. V. Nadler, C. E. Ribak // Brain Res. — 2001. — Vol.890. — № 2. — P. 261-271.

143. De Herdt, V. Early seizures in intracerebral hemorrhage: incidence, associated factors, and outcome [Текст] / V. De Herdt, F. Dumont, H. Henon, P. Derambure, K. Vonck, D. Leys, C. Cordonnier // Neurology. — 2011. — Vol. 77. — №. 20. — P. 1794-1800.

144. De Sarro, G. Anticonvulsant activity of competitive antagonists of NMDA receptor in genetically epilepsy-prone rats [Текст] / G. De Sarro, A. De Sarro. // European Journal of Pharmacology. — 1992 — Vol. 215. — № 2–3. —P. 221-229.

145. Dean III, D. C. Alterations of myelin content in Parkinson's disease: a cross-sectional neuroimaging study [Текст] / D. C. Dean III, J. Sojkova, S. Hurley, S. Kecskemeti, O. Okonkwo, B. B. Bendlin, C. L. Gallagher // PloS one. — 2016. — Vol. 11— № 10.

146. Dejanovic, B. Simultaneous impairment of neuronal and metabolic function of mutated

gephyrin in a patient with epileptic encephalopathy [Текст] / B. Dejanovic, T. Djémié, N. Grünewald, A. Suls, V. Kress, F. Hetsch, D. Craiu, M. Zemel, P. Gormley, D. Lal EuroEPINOMICS Dravet working group, C.T. Myers, H.C. Mefford, A. Palotie, I. Helbig J.C. Meier, P. De Jonghe, S. Weckhuysen, G. Schwarz // EMBO Mol Med. — 2017. — Vol. 9. — № 12. — P. 1764.

147. Delmas, P. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels [Текст] / P. Delmas, D.A. Brown // Nat Rev Neurosci. — 2005. — Vol. 6. — № 11. — P. 850-862.

148. Deonna, T. Epilepsy and autistic disorders [Текст] / T. Deonna, S. Roulet, E. Perez // The neuropsychiatry of epilepsy. Cambridge University Press. — 2011. — P. 24-38.

149. Di Cristo, G. KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders [Текст] / G. Di Cristo, P.N. Awad, S. Hamidi, M. Avoli // Prog Neurobiol. — 2018. — Vol. 162. — P. 1-16.

150. Doboszewska, U. Zinc signaling and epilepsy [Текст] / U. Doboszewska, K. Młyniec, A. Wlaź, E. Poleszak, G. Nowak, P. Wlaź // Pharmacol Ther. — 2019. — Vol. 193. — P. 156-177.

151. Doherty, J.J. Metabotropic glutamate receptors modulate feedback inhibition in a developmentally regulated manner in rat dentate gyrus [Текст] / J.J. Doherty, S. Alagarsamy, K.J. Bough, P.J. Conn, R. Dingledine, D. D. Mott // J. Physiol. 2004. — V.2. — P. 395-401.

152. Dorofeeva, N.A. Effects of ERK1/2 kinases inactivation on the nigrostriatal system of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to audiogenic seizures [Текст] / N.A. Dorofeeva, Y.S. Grigorieva, L.S. Nikitina, E.A. Lavrova, E.V. Nasluzova, M.V. Glazova, E.V. Chernigovskaya // Neurol Res. — 2017. — Vol. 39. — № 10. — P. 918-925.

153. Detlev Boison. Role of adenosine in status epilepticus: a potential new target? [Текст] / Detlev Boison // Epilepsia. — 2013. — Vol. 54. № 6. P. 20-22.

154. Dravet, C. Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy) [Текст] / C. Dravet, H. Oguni // Handb Clin Neurol. — 2013. — Vol. 111. — P. 627-633.

155. Drenthen, G. S. Lower myelin-water content of the frontal lobe in childhood absence epilepsy [Текст] / G. S. Drenthen, E. L. Fonseca Wald, W. H. Backes, M. H. Debeij-Van Hall, J. G. Hendriksen, A. P. Aldenkamp, R.J. Vermeulen, S. Klinkenberg, J. F. Jansen // Epilepsia. — 2019. — Vol. 60. — № 8. — P. 1689-1696.

156. Eide D.J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc [Текст] / D.J Eide // Biochim Biophys Acta. — 2006. — Vol. 1763. — № 7. P. 711-722.

157. El-Shenawy,N. S. Nephrotoxicity of sodium valproate and protective role of L-cysteine in rats at biochemical and histological levels [Текст] / N. S. El-Shenawy, R. Z. Hamza, // Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. — 2016. — Vol. 27. — № 5. — P. 497-504.

158. Esclapez, M. Changes in GABA-immunoreactive cell density during motor focal epilepsy induced by cobalt in the rat [Текст] / M. Esclapez, S. Trottier // Exp. Brain Res. — 1989.—№76.—P. 369-385.

159. Fang, Y. Ketamine for the treatment of refractory status epilepticus [Текст] / Y. Fang, X. Wang // Seizure. — 2015. — Vol. 30. — P. 14-20.

160. Fiest, K.M. Prevalence and incidence of epilepsy [Текст] / K.M. Fiest, [et al.] // Neurology. Lippincott Williams and Wilkins, 2017. — Vol. 88. — № 3. — P. 296–303.

161. Ferriero D.M., Hamrick S.E, McQuillen P.S, Jiang X., Mu D., Madan A. A role for hypoxia-inducible factor-1alpha in desferoxamine neuroprotection [Текст] / D.M. Ferriero, S.E. Hamrick, P.S. McQuillen, X. Jiang, D. Mu, A. Madan // Neurosci Lett. — 2005. — Vol. 379. — № 2. — P. 96-100.

162. Foreman, B. Quantitative EEG for the detection of brain ischemia [Текст] / B. Foreman, J. Claassen // Critical care. — 2012. — Vol. 16. — №. 2. — P. 216.

163. Franceschetti, S. Protein kinase C-dependent modulation of Na+ currents increases the excitability of rat neocortical pyramidal neurons [Текст] / S. Franceschetti, S. Taverna, G. Sancini, F. Panzica, R. Lombardi, G. Avanzini // J. Physiol. — 2000. — Vol. 528. — P. 291-304.

164. Francisco, J.C. Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies [Текст] / J.C. Francisco, A.M. Hayley, C. Waldo // Neural Plasticity. — 2016. — P. 2090-5904.

165. Friedmann Angeli, J. Selenium and GPX4, a vital symbiosis [Текст] / J. Friedmann Angeli, M. Conrad // Free Radic. Biol. Med. — 2018 — Vol. 127. — P. 153–159.

166. Fritschy, J.M. Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity [Текст] / J.M. Fritschy // Front Mol Neurosci. — 2008. — Vol. 1.—№ 5.

167. Gangarossa, G. Contrasting patterns of ERK activation in the tail of the striatum in response to aversive and rewarding signals [Текст] / G. Gangarossa, L. Castell, L. Castro, P. Tarot, F. Veyrunes, P. Vincent, F. Bertaso, E. Valjent // J Neurochem. — 2019. — Vol. 151.—№ 2. — P. 204-226.

168. Gangarossa, G. Convulsant doses of a dopamine D1 receptor agonist result in Erk-dependent increases in Zif268 and Arc/Arg3.1 expression in mouse dentate gyrus [Текст] / G. Gangarossa, M. Di Benedetto, G.J. O'Sullivan, M. Dunleavy, C. Alcacer, A. Bonito-Oliva, D.C. Henshall, J.L. Waddington, E. Valjent, G. Fisone // PLoS One. — 2011. — Vol. 6. — № 5. — P. 19415.

169. Gao, H. Intracellular zinc activates KCNQ channels by reducing their dependence on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [Текст] / H. Gao, A. Boillat, D. Huang, C. Liang, C. Peers, N. Gamper // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2017. — Vol. 114.—№ 31.—P. 6410-6419.

170. Garbuz D.G. Rodent Models of audiogenic epilepsy: genetic aspects, advantages, current problems and perspectives [Текст] / Garbuz D.G., Davletshin A.A., Litvinova S.A., Fedotova I.B., Surina N.M., Poletaeva I.I. // Biomedicines. — 2022. — Vol. 10, N 11. — 2934.

171. Gautam, V. An insight into crosstalk among multiple signaling pathways contributing to Epileptogenesis [Текст] / V. Gautam, K. Rawat, A. Sandhu, P. Kumari, N. Singh, L. Saha // Eur J Pharmacol. — 2021. — Vol. 5. — № 910. — P. 174469.

172. Geis, C. Autoimmune seizures and epilepsy [Текст] / C. Geis, J. Planagumà, M. Carreño, F. Graus, J. Dalmau // J Clin Invest. — 2019. — Vol. 129. — № 3. — P. 926-940.

173. Gerhard S. Drenthen. On the merits of non-invasive myelin imaging in epilepsy, a literature review [Текст] / S. Gerhard, W.H. Backes, A.P. Aldenkamp, R.J. Vermeulen, S. Klinkenberg, J.F.A. Jansen // J Neurosci Methods. — 2020. — Vol. 338. P. 108687.

174. Ghit, A. GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders [Текст] / A. Ghit, D. Assal, A.S. Al-Shami, D.E.E. Hussein // J Genet Eng Biotechnol. — 2021. — Vol. 19. — № 1. — P. 123.

175. Giedroc, D.P. Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation [Текст] / D.P. Giedroc, X. Chen, J.L. Apuy // Antioxid Redox Signal. — 2001. — Vol. 3. — № 4. — P. 577-596.

176. Gill, D. A. Selective reductions in subpopulations of GABAergic neurons in a developmental rat model of epilepsy [Текст] / D. A. Gill, S.L. Ramsay, R.A.Taske // Brain Research. — 2010. — Suppl. 1331. — P 114-123.

177. Glauser, T. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes [Текст] / T. Glauser, E. Ben-Menachem, B. Bourgeois, A. Cnaan, C. Guerreiro, R. Kälviäinen, R. Mattson, J. A. French, E. Perucca, T. Tomson // Epilepsia. — 2013. — Vol. 54, №. 3. — P. 551-563.

178. Glazova, M.V. Inhibition of ERK1/2 signaling prevents epileptiform behavior in rats prone to audiogenic seizures [Текст] / M.V. Glazova, L.S. Nikitina, K.A. Hudik, O.D. Kirillova, N.A. Dorofeeva, A.A. Korotkov, E.V. Chernigovskaya // J Neurochem. — 2015. — Vol. 132. — № 2. — P. 218-229.

179. Gorter, J.A. Increased expression of ferritin, an iron-storage protein, in specific regions of the parahippocampal cortex of epileptic rats [Текст] / J.A. Gorter, A.R. Mesquita, E.A. van Vliet, F.H. da Silva, E. Aronica // Epilepsia. — 2005. — Vol. 46. — № 9. — P. 1371-1379.

180. Gripper, L.B. The causal relationship between neurocysticercosis infection and the development of epilepsy - a systematic review [Текст] / L.B. Gripper, S.C. Welburn // Infect Dis Poverty. — 2017. — Vol. 6. — № 1. — P. 31.

181. Grishin, A.A. Muscarinic receptor stimulation reduces NMDA responses in CA3 hippocampal pyramidal cells via Ca2+-dependent activation of tyrosine phosphatase [Текст] / A.A. Grishin, P. Benquet, U. Gerber // Neuropharmacology. — 2005. — Vol. 49. — P. 328-337.

182. Groenewegen, H.J. Does an imbalance between the dorsal and ventral striatopallidal systems play a role in Tourette's syndrome? A neuronal circuit approach [Текст] / H.J. Groenewegen, O.A. van den Heuvel, D.C, Cath, P. Voorn, D.J. Veltman // Brain & Development. — 2003. — V. 25. — № 1. — P. 13-14.

183. Gruntz, K. Parkinson disease and the risk of epileptic seizures [Текст] / K. Gruntz, M. Bloechliger, C. Becker, S.S. Jick, P. Fuhr, C.R. Meier, S. Rüegg // Annals of Neurology. — 2018. — Vol. 82. — №. 2. — P. 363-374.

184. Grzywacz, A. Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level [Текст] / A.Grzywacz, J. Gdula-Argasińska, B. Muszyńska, M. Tyszka-Czochara, T. Librowski, W. Opoka // Acta Biochim Pol. — 2015. — Vol. 62. — № 3. — P. 491-498.

185. Gu, Z. Regulation of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors by metabotropic glutamate receptor 7 [Текст] / Z. Gu, W. Liu, J. Wei, Z. Yan // J Biol Chem. — 2012. — №287.— P.10265-10275.

186. Gulyaeva, N.V. Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe [Текст] / N.V. Gulyaeva // Biochemistry (Mosc). — 2017. — Vol.82. — № 3. — P. 237-242.

187. Guo, J. Statin treatment reduces the risk of poststroke seizures [Текст] / J. Guo, J. Guo, J. Li, M. Zhou, F. Qin, S. Zhang, B. Wu, L. He, D. Zhou // Neurology. — 2015. — Vol. 85, №. 8. — P. 701-707.

188. Guo, W. Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signaling cascade mediate spinal dorsal horn NMDA receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia [Текст] / W. Guo, F. Wei, S. Zou, M.T. Robbins, S. Sugiyo, T. Ikeda, J.C. Tu, P.F. Worley, R. Dubner, K. Ren // J Neurosci. — 2004. — Vol. 24. — P. 9161-9173.

189. Gupta, G. Cobalt nanoparticles trigger ferroptosis-like cell death (oxytosis) in neuronal cells: potential implications for neurodegenerative disease [Текст] / G. Gupta, A. Gliga, J. Hedberg, A. Serra, D. Greco, B. Fadeel. // FASEB J.—2020.—№ 34.—P. 5262-5281.

190. Haapaniemi, E. The CAVE score for predicting late seizures after intracerebral hemorrhage [Текст] / E. Haapaniemi, D. Strbian, C. Rossi, J. Putaala, T. Sipi, S. Mustanoja, T. Sairanen, S. Curtze, J. Satopää, R. Roivainen, M. Kaste, C. Cordonnier, T. Tatlisumak, A. Meretoja // Stroke. — 2014. — Vol. 45, №. 7. — P. 1971-1976.

191. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine [Текст] / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // 3rd ed. Oxford: Oxford Univ. Press. — 1999.

192. Hauser W.A. Recent developments in the epidemiology of epilepsy [Текст] / W.A. Hauser // Acta Neurol Scand Suppl. — 1995. — Vol. 162. P. 17-21.

193. Hawkinson, J. Steroid inhibition of [3H]-SR 95531 binding to the ГАМКА recognition site. [Текст] / J. Hawkinson, M. Acosta-Burruel, C.L. Kimbrough, D.B. Goodnough, P.L. Wood // Eur. J. Pharmacol. — 1996. — V.304(1–3). — P.141-146.

194. He, J. Cellular mechanisms of cobalt-induced hippocampal epileptiform discharges [Текст] / J. He, H.L Hsiang, C. Wu, S. Mylvagnanam, P.L. Carlen, L. Zhang // Epilepsia. — 2008.— № 50.—P. 99-115.

195. Hernandez, C.C. Dravet syndrome-associated mutations in GABRA1, GABRB2 and GABRG2 define the genetic landscape of defects of GABAA receptors [Текст] / C.C. Hernandez, X. Tian, N. Hu, W. Shen, M.A. Catron, Y. Yang, J. Chen, Y. Jiang, Y. Zhang, R.L. Macdonald // Brain Commun. — 2021. — Vol. 3.—№ 2.

196. Heusner, C.L. Deletion of GAD67 in dopamine receptor-1 expressing cells causes specific motor deficits [Текст] / C.L. Heusner, L.R. Beutler, C.R. Houser, R.D. Palmiter // Genesis. — 2008. — Vol. 46. — № 7. — P. 357-367.

197. Hey, J.G. Extracellular zinc protects against acidosis-induced injury of cells expressing Ca2+-permeable acid-sensing ion channels [Текст] / J.G. Hey, X.P. Chu, J. Seeds, R.P. Simon, Z.G. Xiong // Stroke. — 2007. — Vol.38. — № 2. — P. 670-673.

198. Hirose, S. Mutant GABA(A) receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy [Текст] / S. Hirose // Progress in brain research. — 2011. — Vol. 213. — P. 55-85.

199. Hofer, K.T. Bursting of excitatory cells is linked to interictal epileptic discharge generation in humans [Текст] / K.T. Hofer, Á. Kandrács, K. Tóthet // Sci Rep. — 2022. — № 12.— P. 6280.

200. Hoffmann, K. Epileptic seizures and hippocampal damage after cuprizone-induced demyelination in C57BL [Текст] / K.Hoffmann, M. Lindner, I. Gröticke, M. Stangel, W. Löscher // Exp. Neurol. — 2008. — Vol 210. — P. 308-321.

201. Huang, S., Wan, F., Bi, S., Zhu, J., Niu, Z., and Chen, J. A self-healing integrated all-in-one zinc-ion battery [Текст] / S. Huang, F. Wan, S. Bi, J. Zhu, Z. Niu., J. Chen // Angew. Chem. Int. Ed. — 2019. — Vol. 58 P. 4313–4317.

202. Husari, K.S. Autoimmune Epilepsy [Текст] / K.S. Husari, D. Dubey // Neurotherapeutics. — 2019. — Vol. 16. — № 3. — P. 685-702.

203. Hyde, T.M. Seizures and schizophrenia [Текст] / T.M. Hyde, D.R Weinberger // Schizophr Bull. — 1997. — Vol. 23. — № 4. — P. 611-622.

204. Illingworth, M.A. Elevated VGKCcomplex antibodies in a boy with fever-induced refractory epileptic encephalopathy in school-age children (FIRES) [Текст] / M.A. Illingworth, D. Hanrahan, C.E. Anderson et al. // Dev Med Child Neurol. — 2011. — Vol. 53. — № 11). — P.1053-1057.

205. Inoue, K. Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels [Текст] / K. Inoue, D. Branigan, Z.G. Xiong // J Biol Chem. — 2010. — Vol. 285. — № 10. — P. 7430-7439.

206. Ito Y. Effects of bicuculline on [3H]SR 95531 binding in discrete regions of rat brains. [Текст] / Y. Ito, D.K. Lim, Y. Hayase, Y. Murakoshi, I.K. Ho // Neurochem Res. -1992. — V. 17(4). — P.307-313.

207. Jiang, W. Involvement of extracellular regulated kinase and p38 kinase in hippocampal seizure tolerance [Текст] / W. Jiang., J. Van Cleemput, A.H. Sheerin., S.P. Ji, Y. Zhang, D.M. Saucier, M.E. Corcoran, X. Zhang // J Neurosci Res. — 2005. — Vol. 81. — № 4. — P. 581-588.

208. Jiao, H. Dopamine D (1) and D (3) receptors oppositely regulate [Текст] / H. Jiao, L. Zhang, F. Gao, D. Lou, J. Zhang, M. Xu // J Neurochem. — 2007. — Vol. 103. — P. 840-848.

209. Jiruska, P. Synchronization and desynchronization in epilepsy: controversies and hypotheses [Текст] / P. Jiruska, M. de Curtis, J.G. Jefferys, C.A. Schevon, S.J. Schiff, K. Schindler // J Physiol. — 2013. — Vol. 591. — № 4. — P. 787-797.

210. Jobst, B.C. Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: a review [Текст] / B.C. Jobst, G.D Cascino // JAMA. — 2015. — Vol. 313. — № 3. — P. 285-293.

211. Jon Andresen, J. Endothelial influences on cerebrovascular tone [Текст] / J. Jon Andresen, N. I. Shafi, R. M. Bryan Jr // Journal of applied physiology. — 2006. — Vol. 100, №. 1. — P. 318-327.

212. Jope R.S. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. [Текст] / R.S. Jope, R.A. Morrisett, O.C. Snead // Exp. Neurol. — 1986. — V.91. — P.471-480.

213. Jordan, K. G. Emergency EEG and continuous EEG monitoring in acute ischemic stroke [Текст] / K. G. Jordan // Journal of Clinical Neurophysiology. — 2004. — Vol. 21, №. 5. — P. 341-352.

214. Josephson, C.B. Psychiatric comorbidities in epilepsy [Текст] / C.B. Josephson, N. Jetté // Int Rev Psychiatry. — 2017. — Vol. 29. — P. 409-424.

215. Kahn-Kirby, A.H.Targeting ferroptosis: a novel therapeutic strategy for the treatment of mitochondrial disease-related epilepsy [Текст] / A.H. Kahn-Kirby, A. Amagata, C.I. Maeder, J.J. Mei, S. Sideris, Y. Kosaka, A. Hinman, S.A. Malone, J.J. Bruegger, L. Wang, V. Kim, W.D. Shrader, K.G. Hoff, J.C. Latham, E.A. Ashley, M.T. Wheeler, E. Bertini, R. Carrozzo, D. Martinelli, C. Dionisi-Vici, K.A. Chapman, G.M. Enns, W. Gahl, L.Wolfe, R.P. Saneto, S.C. Johnson, J.K. Trimmer, M.B. Klein, C.R. Holst // PLoS One. — 2019. — Vol. 14.

216. Kang, H. The effects on cognitive function and behavioral problems of topiramate compared to carbamazepine as monotherapy for children with benign rolandic epilepsy [Текст] / H.

Kang, B. Eun, C. Wu Lee, H. Ku Moon, J. Kim, D. Wook Kim [et al] // Epilepsia. — 2007. — №48.—P. 1716-1723.

217. Kang, J.Q.The human epilepsy mutation GABRG2(Q390X) causes chronic subunit accumulation and neurodegeneration [Текст] / J.Q. Kang, W. Shen, C. Zhou // Nat Neurosci. — 2015. — Vol. 18. — P. 988-996.

218. Kanner, A.M. The use of monotherapy in patients with epilepsy: an appraisal of the new antiepileptic drugs [Текст] / A.M. Kanner, A.J. Balabanov // Curr Neurol Neurosci Rep. — 2005. — Vol. 5. — № 4. P. 322-328.

219. Kapur, J. Role of NMDA receptors in the pathophysiology and treatment of status epilepticus [Текст] / J. Kapur // Epilepsia Open. — 2018. — Vol. 3. — № 2. — P. 165-168.

220. Kavroulakis, E. Papadaki Myelin content changes in probable Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: associations with age and severity of neuropsychiatric impairment [Текст] / E. Kavroulakis, P.G. Simos, G. Kalaitzakis, T.G. Maris, D. Karageorgou, I. Zaganas, S. Panagiotakis, M. Basta, A. Vgontzas, // J. Magn. Reson. Imaging. — 2018. — Vol. 47. — P. 1359-1372.

221. Keller, L. Does treatment with t-PA increase the risk of developing epilepsy after stroke? [Текст] / L. Keller, C. Hobohm, S. Zeynalova, J. Classen, P. Baum // Journal of neurology. — 2015. — Vol. 262. — №. 10. — P. 2364-2372.

222. Kelley, M.R. Locally Reducing KCC2 Activity in the Hippocampus is Sufficient to Induce Temporal Lobe Epilepsy [Текст] / M.R. Kelley, R.A. Cardarelli, J.L. Smalley, T.A. Ollerhead, P.M. Andrew, N.J. Brandon, T.Z. Deeb, S.J. Moss // EBioMedicine. — 2018. — Vol. 32. — P. 62-71.

223. Kelly, K. M. Animal modeling of poststroke seizures and epilepsy: 5-year update [Текст] / K. M. Kelly // Epilepsy currents. — 2007. — Vol. 7, №. 6. — P. 159-162.

224. Kinnavane, L. Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory [Текст] / L. Kinnavane, M. Mathieu Albasser, J. P. Aggleton // Behavioural Brain Research. — 2015. — Vol. 285. — P. 67-78.

225. Klein, P. Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: Do they translate? [Текст] / P. Klein // Epilepsia. 2018. — Т. 59. — № 1. — С. 37-66.

226. Klitgaard, H. Electrophysiological, neurochemical and regional effects of Levetiracetam in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. [Текст] / H. Klitgaard, A. Matagne, R. Grimee, J. Vanneste-Goemaere, D.G. Margineanu // Seizure. — 2003. — V. 12. — P.92-100.

227. Knowles, J.K. Maladaptive myelination promotes seizure progression in generalized epilepsy [Текст] / H. Xu, C. Soane, A. Batra, T. Saucedo, E. Frost, L.T. Tam, D. Fraga, L. Ni, K. Villar, S. Talmi, J.R. Huguenard, M. Monje // Nat Neurosci. — 2022. — Vol. 25. — № 25. — P. 539-540.

228. Kohling, R. Potassium Channels in Epilepsy [Текст] / R. Kohling, J. Wolfart // Cold Spring Harb Perspect Med. — 2016. — Vol. 6. — № 5.

229. Kolind, S. Brain and cord myelin water imaging: a progressive multiple sclerosis biomarker [Текст] / S. Kolind, A. Seddigh, A. Combes, B. Russell-Schulz, R. Tam, V. Yogendrakumar, P. A. Brex // NeuroImage: Clinical. — 2015. — Vol. 9. — P. 574-580.

230. Kopeloffs, L.M. Experimental epilepsy in mouse [Текст] / L.M. Kopeloffs // Proc. Soc. Exp. Biol. — 1960 — № 104.—P. 500-504.

231. Krishnasarma Pathy. Galantamine Pharmacological Screening and Toxicology [Текст]/ Krishnasarma Pathy // J of Pharmacol & Clin Res 5(1): JPCR.MS.ID. 555653 (2018).

232. Kryzhanovskiy, G. N. Determinantal structures in pathology of the nervous system. Determinantnye struktury v patologii nervnoi sistemy [Текст]/ G. N. Kryzhanovskiy // Moscow. — 1980.—P. 359.

233. Kutepova I. Levetiracetam effect on bioelectric activity in model of global ischemia in rats [Текст] / I. S. Kutepova, A. Petrunina, S. A. Litvinova // World Brain Congress. — 2019.

234. Lalchandani, R. R. Dopamine D2 receptors regulate collateral inhibition between striatal medium spiny neurons [Текст] / R. R. Lalchandani., M. S. van der Goes, J. G. Partridge, S. Vicini // J. Neurosci. — 2013. — Vol. 33. — P. 14075-14086.

235. Lalonde, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation [Текст] / R. Lalonde // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. — 2002. — Vol. 26(1). — P.91-104.

236. Lang, D. J. 48 echo T2 myelin imaging of white matter in first-episode schizophrenia: evidence for aberrant myelination [Текст] / D. J. Lang, E. Yip, A. L. MacKay, A. E. Thornton, F. Vila-Rodriguez, G. W. MacEwan, W. G. Honer // NeuroImage: Clinical. — 2014. — Vol. 6. — P. 408-414.

237. LaPage, K. Differintial binding properties of [G3H] dextorfan and [G3H]MK-801 in heterologously expressed NMDA receptors. [Текст] / K.T. LaPage, J.E. Ishmael, C.W. Low, S.F. Traynelis, T.F. Murray // Neuropharm. — 2005. — Vol. 49. — P. 1-16.

238. Lapato, A.S. Chronic demyelination-induced seizures [Текст] / A.S. Lapato, J.I. Szu, J.P.C. Hasselmann, A.J. Khalaj, D.K. Binder, S.K. Tiwari-Woodruff // Neuroscience. — 2017. — Vol. 346. — P. 409-422.

239. Lee, S. M. SKF-83959 is not a highly-biased functionally selective D1 dopamine receptor ligand with activity at phospholipase C [Текст] / Lee, S. M. // Neuropharmacology. — 2014. — Т. 86. — С. 145-154.

240. Lee, S.Y.Cognitive function and neuropsychological comorbidities in children with newly diagnosed idiopathic epilepsy [Текст] / S.Y. Lee, J. Park, S. Park, Y. Kim, K.Y. Lee // J Korean Med.—2017.

241. Leite J.P. New insights from the use of pilocarpine and kainate models [Текст] / J.P. Leite, N. Garcia-Cairasco and E.A. Cavalheiro // Epilepsy Research—2002. — V. 50, Issues 1-2. — P. 93-103.

242. Levinsohn, P.M. Safety and tolerability of topiramate in children [Текст] / P.M Levinsohn // J. Child. Neurol. — 2000. — Vol. 15. — P.22-26.

243. Li, Y.C. D2 receptor overexpression in the striatum leads to a deficit in inhibitory transmission and dopamine sensitivity in mouse prefrontal cortex [Текст] / Y.C. Li, C. Kellendonk, E.H. Simpson, E.R. Kandel, W.J. Gao // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A2011 — 2011. — Vol. 108. — P. 12107-12112.

244. Lim, A. The mitochondrial epilepsies [Текст] / A. Lim, R.H. Thomas // Eur J Paediatr Neurol. — 2020. — Vol. 24. — P. 47-52.

245. Litvinova S.A. Effect of ischemic brain damage on bioelectric activity in model of global ischemia in rats [Текст] / S. A Litvinova., I. S. Kutepova // 5th Annual Conference on Stroke and Neurological Disorders. — 2018.

246. Litvinova S. A. Levetiracetam effect and electrophysiological mechanism of action in rats with cobalt-induced chronic epilepsy [Текст] / S. A. Litvinova, T. A Voronina, L. N. Nerobkova, I. S. Kutepova, G.G. Avakyan, G.N. Avakyan // European journal of pharmacology. — 2019. — Vol. 854. — P. 380-386.

247. Litvinova S. A. Levetiracetam effect on behavioral and electrophysiological parameters in rat model of global brain ischemia [Текст] / Litvinova S. A., Kutepova, I. S., Voronina, T. A., & Petrunina, A. A. // Epilepsy Research. — 2020. — Т. 167. — С. 106466.

248. Litvinova. Svetlana A. ERK1/2 kinases and dopamine D2 receptors participate in the anticonvulsant effects of a new derivative of benzoylpyridine oxime and valproic acid [Текст] / Svetlana A. Litvinova, Tatyana A. Voronina, Evgeny A. Kondrakhin, Igor O. Gaydukov, Artem I. Davletshin, Ekaterina V. Vasileva, Georgy I. Kovalev, David G. Garbuz. // European Journal of Pharmacology. 2021. 15; 903. P. 174150 (статья).

249. Litvinova S. A.Participation of Brain Receptors in the Mechanism of Anticonvulsant Action of the New 4-Benzoylpyridine Oxime Derivative GIZH-298. [Текст] / Litvinova S. A., Kondrakhin E. V., Voronina T. A., Vasil’eva E. V., and Kovalev G. I. // Neurochemical Journal. — 2023. Vol. 17, No. 1, pp. 75–83.

250. Lin Lin Lee, V. Therapy and Management of Metabolic Epilepsy: A Systematic Review [Текст] / V. Lin Lin Lee, B. Kar Meng Choo, Y.S. Chung, U.P. Kundap, Y. Kumari, M.F. Shaikh // Int J Mol Sci. — 2018. — Vol. 19. — № 3. — P. 871.

251. Lin, T.Y.Hispidulin inhibits the release of glutamate in rat cerebrocortical nerve terminals [Текст] / T.Y. Lin, C.W. Lu, C.C. Wang, J.F. Lu, S.J. Wang // Toxicol Appl Pharmacol. — 2012. —

Vol. 263. — № 2. — P. 233-243.

252. Liu, W. Adrenergic modulation of NMDA receptors in prefrontal cortex is differentially regulated by RGS proteins and spinophilin[Текст] / W. Liu., E.Y. Yuen, P.B. Allen, J. Feng, P. Greengard, Z. Yan // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2006. — Vol. 103. — P. 18338-18343.

253. Liu, Y. Interplay between MTOR and GPX4 signaling modulates autophagy-dependent ferroptotic cancer cell death [Текст] / Y. Liu, Y. Wang, J. Liu, R. Kang, D. Tang // Cancer Gene Ther. — 2020.

254. Liu, Y.R. Progressive Metabolic and Structural Cerebral Perturbations After Traumatic Brain Injury: An In Vivo Imaging Study in the Rat [Текст] / Y.R. Liu [et al.] // J. Nucl. Med. — 2010. — Vol. 51. — № 11. — P. 1788-1795.

255. Liuzzi, J.P. Mammalian zinc transporters [Текст] / J.P. Liuzzi, R.J. Cousins // Annu Rev Nutr. — 2004.—№24.—P.151-172.

256. Löscher, W. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development [Текст] / W. Löscher, H. Klitgaard, R.E. Twyman, D. Schmidt // Nat Rev Drug Discov. — 2013. — Vol. 12. — № 10. — P. 757-776.

257. Löscher, W. Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond [Текст] / W. Löscher, M. Gillard, Z.A. Sands, R.M. Kaminski, H. Klitgaard // CNS Drugs. — 2016. — Vol. 30.—№ 11. — P. 1055-1077.

258. Luo, Y. Alterations in hippocampal myelin and oligodendrocyte precursor cells during epileptogenesis [Текст] / Y. Luo, Q. Hu, Q. Zhang, S. Hong, X. Tang, L. Cheng, L. Jiang // Brain Res. 1627. — 2015. — P. 154-164.

259. Mafra, R.A. Glutamate transport in rat cerebellar granule cells is impaired by inorganic epileptogenic agents [Текст] / R.A. Mafra, D.A. Araujo, P.S. Beirao, J.S. Cruz // Neurosci. Lett. — 2001.—№310.—P. 85-88.

260. Marin-Valencia, I. Pathogenetic mechanisms of focal cortical dysplasia [Текст] / I. Marin-Valencia, R. Guerrini, J.G. Gleeson // Epilepsia. — 2014. — Vol 55. — № 7. — P. 970-978.

261. Marusic, P.M. Clinical characteristics in patients with hippocampal sclerosis with or without cortical dysplasia [Текст] / P.M. Marusic, P. Krsek, H. Krijtova, J. Zarubova, J. Zamecnic, M. Mohapl, V. Benes, M. Tichi, V.T. Komarek // Epileptic Disord. — 2007. — Vol. 9.—№ 1. P. 75-82.

262. Marzouk, A.A. Design, synthesis and anticonvulsant activity of new imidazolidindione and imidazole derivatives [Текст] / A.A. Marzouk, A.K.A. Bass, M.S. Ahmed, A.A. Abdelhamid, Y.A.M.M. Elshaier, A.M.M. Salman, O.M. Aly // Bioorg Chem. — 2020. — Vol. 101. — P. 104020.

263. Matthieu, J.M. Anticonvulsive treatment of myelin-deficient (mld) mice improves survival and confirms the delayed increase of myelin basic protein [Текст] / J.M. Matthieu, P. Eggenberger, G. Almazan, H. Ginalski-Winkelmann // Neurochem Pathol. — 1984. — Vol. 2. — № 2.

— P. 115-121.

264. Mefford, H.C. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies [Текст] / H.C. Mefford, S.C. Yendle, C. Hsu [et al.] // Ann Neurol. — 2011. — Vol. 70.—№ 6. — P. 974-985.

265. Mele, M. Alterations in GABA(A)-receptor trafficking and synaptic dysfunction in brain disorders [Текст] / M. Mele, R.O. Costa, C.B. Duarte // Front Cell Neurosci. — 2019. — Vol. 13. — №77.

266. Mikaeloff, Y. Devastating epileptic encephalopathy in school-aged children (DESC): a pseudo encephalitis [Текст] / Y. Mikaeloff, I. Jambaqué, L. Hertz-Pannier, A. Zamfirescu, C. Adamsbaum, P. Plouin, O. Dulac, C. Chiron // Epilepsy Res. — 2006. — Vol. 69. — № 1. — P. 67-79.

267. Minotti, G. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide [Текст] / G. Minotti, S.D. Aust // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 1098-1104.

268. Moloney, P.B. Epilepsy in the mTORopathies: opportunities for precision medicine [Текст] / P.B. Moloney, G.L. Cavalleri, N. Delanty // Brain Commun. — 2021. — Vol. 3. — № 4.

269. Morell, P. Myelin Formation, Structure and Biochemistry [Текст] / P. Morell, R. Quarles // Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. — 1999.

270. Morimoto, K. Antiepileptic effects of tiagabine, a selective GABA uptake inhibitor, in the rat kindling model of temporal lobe epilepsy [Текст] / K. Morimoto, H. Sato, Y. Yamamoto, T. Watanabe, H. Suwaki // Epilepsia. — 1997. — Vol. 38.—P. 966-974.

271. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. [Текст] / R. Morris // J. Neurosci. Meth. — 1984. — V. 11(1). — P. 47-60.

272. Muroi, J. An MRI study of the myelination pattern in West syndrome [Текст] / J. Muroi, T. Okuno, C. Kuno, T. Yorifuji, K. Shimizu, M. Matsumura, Y. Takahashi, T. Okuno, M. Matsuo // Brain Dev. — 1996. — Vol. 18. — № 3. — P. 179-184.

273. Nateri, A.S. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity [Текст] / A.S. Nateri, G. Raivich, C. Gebhardt, C. Da Costa, H. Naumann, M. Vreugdenhil, M. Makwana, S. Brandner, R.H. Adams, J.G. Jefferys, O. Kann, A. Behrens // EMBO. — 2007. — Vol. 26.—№ 23.—P. 4891-4901.

274. Naylor, D.E. Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus [Текст] / D.E. Naylor, H. Liu, J. Niquet, C.G. Wasterlain // Neurobiol Dis. — 2013. — Vol. 54. — P. 225-238.

275. Nazıroğlu, M. Effects of antiepileptic drugs on antioxidant and oxidant molecular pathways: focus on trace elements [Текст] / M. Nazıroğlu, V.A. Yürekli // Cell Mol Neurobiol. — 2013. — Vol. 33. — № 5. — P. 589-599.

276. Nicholas, R. Temporal lobe cortical pathology and inhibitory GABA interneuron cell loss are associated with seizures in multiple sclerosis [Текст] / R. Nicholas, R. Magliozzi, G. Campbell, D. Mahad, R. Reynolds // Multiple Sclerosis Journal. — 2016. — Vol. 22. — № 1. — P. 25-35.

277. Nihei, Y. Alpha-Tocopheryl-L-ascorbate-2-O-phosphate diester, a hydroxyl radical scavenger, prevents the occurrence of epileptic foci in a rat model of post-traumatic epilepsy [Текст] / Y. Nihei, K. Hideaki, M. Sigekiyo, O. Norio, Y. Isao // Pathophysiology. — 2002. — Vol. 8. — P. 205-214.

278. Nikbakht, F.How does the COVID-19 cause seizure and epilepsy in patients? The potential mechanisms [Текст] / F. Nikbakht, A. Mohammadkhanizadeh, E. Mohammadi // Mult Scler Relat Disord. — 2020. — Vol. 46. — P. 102535.

279. O'Connor, W.T. Animal models of traumatic brain injury: A critical evaluation [Текст] / W.T. O'Connor, A. Smyth, M.D. Gilchrist // Pharmacol. Ther. — 2011. — Т. 130. — № 2. — P. 106-113.

280. O'Gorman, R. L. Coupling between resting cerebral perfusion and EEG [Текст] / R. L. O'Gorman, S. S. Poil, D. Brandeis, P. Klaver, S. Bollmann, C. Ghisleni, R. Lüchinger, E. Martin, A. Shankaranarayanan, D. C. Alsop, L. Michels // Brain topography. — 2013. — Vol. 26. — №. 3. — P. 442-457.

281. Okudan, Z.V. Reflex epilepsy: triggers and management strategies [Текст] / Z.V. Okudan, C. Özkara // Neuropsychiatric Disease and Treatment. — 2018. — Vol. 18. — № 14. — P. 327-337.

282. Oliveira, A.A. Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: cholinergic muscarinic system involvement [Текст] / A.A. Oliveira, C.R. Nogueira, V.S. Nascimento, L.M. Aguiar, R.M. Freitas, F.C. Sousa, G.S. Viana, M.M. Fonteles // Neurosci Lett. — 2005. — Sep 16.—№385(3). — P.184-188.

283. Onozuka, M. Induction of epileptic seizures activity by specific protein from cobalt-induced epileptogenic cortex in rats [Текст] / M. Onozuka, S. Iman // Brain Res. — 1990. — №507.— P. 143-145.

284. Otte, W.M. Focal neocortical epilepsy affects hippocampal volume, shape, and structural integrity: a longitudinal MRI and immunohistochemistry study in a rat model [Текст] / W.M. Otte, P. Bielefeld, R.M. Dijkhuizen, K.P. Braun // Epilepsia. — 2012. — Vol. 53. — № 7. — P. 1264-1273.

285. Ounjaijean, S. Increase in non-transferrin bound iron and the oxidative stress status in epilepsy patients treated using valproic acid monotherapy [Текст] / S. Ounjaijean, T. Westermarck, M.

Partinen, E. Plonka-Poltorak, P. Kaipainen, M. Kaski // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. — 2011. — Vol. 49. — P. 268-276.

286. Oyrer, J. Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies [Текст] / J. Oyrer, S. Maljevic, I.E. Scheffer, S.F. Berkovic, S. Petrou, C.A. Reid // Pharmacol Rev. — 2018. — Vol. 70. — № 1. — P. 142-173.

287. Pandis, D. Seizures in Alzheimer disease: clinical and epidemiological data [Текст] / D. Pandis, N. Scarmeas // Epilepsy Curr. — 2012. — Vol. 12. — № 5. — P. 184-187.

288. Pearson S.J. Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phtalaldehyde-sulphite derivatives. [Текст] / S.J.Pearson, C. Czudek, K. Mercer, G.P. Reynolds // J Neuronal. Transm. — 1991. — V.86. — P.151-157.

289. Perez-Clausell, J.Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons [Текст] / J. Perez-Clausell, G. Danscher // A histochemical study. Brain Res. — 1985. — Vol. 337. — P. 91-98.

290. Pernice, H.F. mTOR and MAPK: from localized translation control to epilepsy [Текст] / H.F. Pernice, R. Schieweck, M.A. Kiebler, B. Popper // BMC Neurosci. — 2016. — Vol. 17. — №. 1. — P. 73.

291. Perraud, A.L. TRPM2 Ca2+ permeable cation channels: from gene to biological function [Текст] / A.L. Perraud, C. Schmitz, A.M. Scharenberg // Cell Calcium. — 2003. — Vol. 33(5-6). — P. 519-531.

292. Perucca, P. The Genetics of Epilepsy [Текст] / P. Perucca, Melanie M. Bahlo, S.F. Berkovic // Annual Review of Genomics and Human Genetics. — 2020. — Vol. 31. — №21. — P. 205-230.

293. Pitkänen, A. Epilepsy After Traumatic Brain Injury [Текст] / A. Pitkänen, [et al.] // Models of Seizures and Epilepsy: Elsevier— 2017. — P. 661-681.

294. Pitkänen A. What Can We Model? [Текст] /A. Pitkänen, [et al.] // Models of Seizures and Epilepsy: Elsevier. — 2017.—P. 1-3.

295. Porsolt, R.D. Behavioural despair' in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine [Текст] / R.D. Porsolt, A. Bertin, M. Jalfre // Eur. J. Pharmacol. — 1978. — Vol. 51. — №. 3. — P. 291-294.

296. Porsolt, R.D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments [Текст] / R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M. Jalfre // Nature. — 1977. — Vol. 266. — P. 730-732.

297. Poser, C.M. Epilepsy and multiple sclerosis [Текст] / C.M. Poser, V.V. Brinar // Epilepsy Behav — 2003 — Vol. 4. — №. 1. — P. 6-12.

298. Poulain, P. Levetiracetam opposes the action of GABAA antagonists in hypothalamic neurons [Текст] / P. Poulain, D.G. Margineanu // Neuropharmacology. — 2002. — №42(3).—P. 346—52.

299. Procaccianti, G. Seizures in acute stroke: incidence, risk factors and prognosis [Текст] / G. Procaccianti, A. Zaniboni, F. Rondelli, M. Crisci, T. Sacquegna // Neuroepidemiology. — 2012. — Vol. 39. — №. 1. — P. 45-50.

300. Qing, Y. Inhibition of ferroptosis processes ameliorates cognitive impairment in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy in rats [Текст] / Y. Qing, Z. Chunmei, D. Le, W. Yuejuan, H. Qi, W. Yuan // Am. J. Transl. Res. — 2019. — Vol. 11. — P. 875-884.

301. Rabiller, G. Perturbation of brain oscillations after ischemic stroke: a potential biomarker for post-stroke function and therapy [Текст] / G. Rabiller, J. W. He, Y. Nishijima, A. Wong, J. Liu // International journal of molecular sciences. — 2015. — Vol. 16. — №. 10. — P. 25605-25640.

302. Rajput, S.A. Correction: Ameliorative Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Growth Performance, Immune Function, Antioxidant Capacity, Biochemical Constituents, Liver Histopathology and Aflatoxin Residues in Broilers Exposed to Aflatoxin B [Текст] / Rajput SA, Sun L, Zhang N, Khalil MM, Gao X, Ling Z, Zhu L, Khan FA, Zhang J, Qi D. // . Toxins 2017, 9, 371. Toxins (Basel). — 2018. — Vol. 10. — № 9. — P.366.

303. Rana, A.The role of inflammation in the development of epilepsy [Текст] / A. Rana, A.E. Musto // J Neuroinflammation. — 2018. — Vol. 15. — № 1. — P. 144.

304. Reddy, C. Metabolic Epilepsy [Текст] / C. Reddy, A.G. Saini // Indian Journal of pediatric. — 2021. — Vol. 88. — № 10. — P. 1025-1032.

305. Reinhard, M. Dynamic cerebral autoregulation in acute ischemic stroke assessed from spontaneous blood pressure fluctuations [Текст] / M. Reinhard, M. Roth, B. Guschlbauer, A. Harloff, J. Timmer, M. Czosnyka, A. Hetzel // Stroke. — 2005. — Vol. 36. — №. 8. — P. 1684-1689.

306. Rigoulot, M.A. Neuroprotective properties of topiramate in the lithiumpilocarpine model of epilepsy [Текст] / M.A. Rigoulot, E. Koning, A. Ferrandon [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004. — V. 308. — № 2. — P. 787-795.

307. Rizzo, M. Principles and practice of Behavioral Neurology and Neuropsychology [Текст] / M. Rizzo, P.J. Eslinger // Philadelphia: Saunders. — 2004. — P. 1168.

308. Rodríguez-Muñoz, M. Fenfluramine Diminishes NMDA Receptor-Mediated Seizures via its Mixed Activity at Serotonin 5HT2A and Type 1 Sigma Receptors [Текст] / M. Rodríguez-Muñoz, P. Sánchez-Blázquez, J. Garzón // Oncotarget. — 2018. — Vol. 9. — P. 23373-23389.

309. Rodríguez-Muñoz, M. The σ1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control [Текст] / M. Rodríguez-Muñoz, P. Sánchez-Blázquez, R. Herrero-Labrador, R. Martínez-Murillo, M. Merlos, J.M. Vela, J. Garzón //

Antioxid Redox Signal. — 2015. — Vol. 22.—№ 10. — P. 799-818.

310. Rogawski, M.A. Revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target [Текст] / M.A. Rogawski // Epilepsy Curr. — 2011. — Vol. 11. — P. 56-63.

311. Roggenhofer, E. Clinical phenotype modulates brain's myelin and iron content in temporal lobe epilepsy [Текст] / E. Roggenhofer, E. Toumpouli, M. Seeck, R. Wiest, A. Lutti, F. Kherif, J. Novy, A.O. Rossetti, B. Draganski // Brain Struct Funct. — 2022. — Vol. 227. — № 3. — P. 901-911.

312. Roivainen, R. Young adult ischaemic stroke related acute symptomatic and late seizures: risk factors [Текст] / R. Roivainen, E. Haapaniemi, J. Putaala, M. Kaste, T. Tatlisumak // European journal of neurology. — 2013. — Vol. 20.—№. 9. — P. 1247-1255.

313. Rojas, A. Ionotropic glutamate receptors: regulation by G-protein-coupled receptors [Текст] / A. Rojas, R. Dingledine // Molecular Pharmacology. — 2013. — Vol. 83. — P. 746-752.

314. Rowley, N.M. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets of seizure control [Текст] / N.M. Rowley, K.K. Madsen, A. Schousboe // Neurochem. — Int. 2012. — V. 61. — №4. — P. 546-558.

315. Saad, K. Trace element, oxidant, and antioxidant enzyme values in blood of children with refractory epilepsy [Текст] / K. Saad, E. Hammad, A.F. Hassan, R. Badry // Int J Neurosci. — 2014. — Vol. 124. — № 3. — P. 181-186.

316. Sah, N. L-pglu-(2-propyl)-l-his-l-pronh2 attenuates 4-aminopyridine-induced epileptiform activity and sodium current: a possible action of new thyrotropin-releasing hormone analog for its anticonvulsant potential [Текст] / N. Sah, S. K. Rajput, J. N. Singh, L. Meena Cc, R. Jain, S. K. Sikdar, S. S. Sharma // Neuroscience. — 2011. — Vol. 199. — P. 74-85.

317. Salter, M.W. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation [Текст] / M.W. Salter, L.V. Kalia // Nat Rev Neurosci. — 2004. — Vol. 5. — P. 317-328.

318. Sánchez-Blázquez, P. Cannabinoid receptors couple to NMDA receptors to reduce the production of NO and the mobilization of zinc induced by glutamate [Текст] / P. Sánchez-Blázquez, M. Rodríguez-Muñoz, A. Vicente-Sánchez, J. Garzón // Antioxid Redox Signal. — 2013. — Vol. 19. — P. 1766-1782.

319. Schaffhauser H. In vitro binding characteristics of a new selective group II metabotropic glutamate receptor radioligand, [3H]LY354740, in rat brain. [Текст] / H. Schaffhauser, J.G. Richards, J. Cartmell, S. Chaboz, J.A. Kemp, A. Klingelschmidt, J Messer., H. Stadler, T Woltering., V. Mutel // Molecular Pharmacology. — 1998. — V. 53. — P. 228-233.

320. Scharfman, H. E. Granule-like neurons at the Hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: Functional implications of seizure-induced neurogenesis [Текст] / H. E.S charfman, J. H. Goodman, A. L. Sollas // J. Neurosci. — 2000. — Vol.

16. — P. 6144-6158.

321. Scharfman, H.E. The neurobiology of epilepsy [Текст] / H.E. Scharfman // Current neurology and neuroscience reports. — 2007. — V. 7. — №4. — P. 348-354.

322. Scheffer, I.E. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology [Текст] / I.E. Scheffer, S. Berkovic, G. Capovilla, M.B. Connolly, J. French, L. Guilhoto, E. Hirsch, S. Jain, G.W. Mathern, S.L. Moshé, D.R. Nordli, E. Perucca, T. Tomson, S. Wiebe, Y.H. Zhang, S.M. Zuberi // Epilepsia. — 2017. — Vol. 58.—№ 4. — P. 512-521.

323. Schmidt, D. Behavioural abnormalities and retention rates of anti-epilepsy drugs during long-term treatment of epilepsy: a clinical perspective [Текст] / D. Schmidt // Acta Neurol Scand Suppl. — 1995. — Vol. 162. — P. 7-10.

324. Schropp, C. Delayed myelination in children with West syndrome: an MRI-study [Текст] / C. Schropp, M. Staudt, F. Staudt, K. Bise, N. Obletter, A. Breit, H.M. Weinmann // Neuropediatrics. — 1994. — Vol. 25. — P. 116-120.

325. Serafini, A. Are early seizures predictive of epilepsy after a stroke? Results of a population-based study [Текст] / A. Serafini, G. L. Gigli, G. Gregoraci, F. Janes, I. Cancelli, S. Novello, M. Valente // Neuroepidemiology. — 2015. — Vol. 45. — №. 1. — P. 50-55.

326. Seven, M.Deficiency of selenium and zinc as a causative factor for idiopathic intractable epilepsy [Текст] / M. Seven, S.Y. Basaran, M. Cengiz, S. Unal, A. Yuksel // Epilepsy Res. — 2013. — Vol. 104. — № 1.—P. 35-39.

327. Sharma, P. Delayed myelination and neurodevelopment in male seizure-prone versus seizure-resistant rats [Текст] / P. Sharma, K.L. Powell, M.E. Wlodek, T.J. O'Brien, K.L. Gilby // Epilepsia. — 2018. — Vol. 59. — № 4. — P. 753-764.

328. Sharma, P.Differences in whitematter structure between seizure prone (FAST) and seizure resis-tant (SLOW) rat strains [Текст] / P. Sharma, D.K. Wright, L.A. Johnston, K.L. Powell, M.E. Wlodek, S.R. Shultz, T.J. O'Brien, K.L. Gilby // Neurobiol Dis. — 2017. — Vol. 104. — P. 33-40.

329. Shaye, H.Molecular mechanisms of metabotropic GABA [Текст] / H. Shaye, B. Stauch, C. Gati, V. Cherezov // Sci. Adv. — 2021. — Vol. 7. — P.3362.

330. Sherafat, M.A. Kindling-induced learning deficiency and possible cellular and molecular involved mechanisms [Текст] / M.A. Sherafat, A. Ronaghi, L. Ahmad-Molaei, M. Nejadhoseynian, R. Ghasemi, A. Hosseini, N. Naderi, F. Motamedi // Neurol Sci. — 2013. — Vol. 34. — № 6. — P. 883-890.

331. Shishmanova-Doseva, M.Anticonvulsant Effects of Topiramate and Lacosamide on Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Rats: A Role of Reactive Oxygen Species and Inflammation

[Текст] / M. Shishmanova-Doseva, L. Peychev, L. Yoanidu, Y. Uzunova, M. Atanasova, K. Georgieva, J. Tchekalarova // Int. J. Mol. Sci. — 2021. — Vol. 22. — P. 2264.

332. Specchio, N. New-onset refractory status epilepticus and febrile infection-related epilepsy syndrome [Текст] / N. Specchio, N. Pietrafusa // Dev Med Child Neurol. — 2020. — Vol. 62. — № 8. — P. 897-905.

333. Standard Operating Procedure for Y-maze Spontaneous Alternation Test. Режим доступа https: // med.stanford. edu/content/dam/sm/sbfnl/documents/ resourcesharing/ sop/ymsa.pdf.

334. Stanojlović, O. Two Types of Seizures in Homocysteine Thiolactone-Treated Adult Rats, Behavioral and Electroencephalographic Study [Текст] / O. Stanojlović, A. Rašić-Marković, D. Hrnčić, V. Šušić, D. Macut, T. Radosavljević, D. Djuric // Cellular and Molecular Neurobiology.— 2008.—№ 29(3).—P. 329-339.

335. Starr, M. S. Regulation of seizure threshold by D1 versus D2 receptors", in D1/D2 Dopamine Receptor Interactions [Текст] / M. S. Starr // Ed. Waddington J. New York: Academic Press. — 1993. — P. 235-269.

336. Steinhäuser,C. Astrocyte dysfunction in epilepsy [Текст] / C. Steinhäuser, G. Seifert // Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). — 2012.

337. Stellwagen, D. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha [Текст] / D. Stellwagen, E.C. Beattie, J.Y. Seo, R.C. Malenka // Journal of Neuroscience. — 2005. — Vol. 25. — №. 12. — P. 3219 -3228.

338. Strasser, L. Prevalence and risk factors for autism spectrum disorder in epilepsy: a systematic review and meta-analysis [Текст] / L. Strasser, M. Downes, J. Kung, J.H. Cross, Haan M. De // Dev Med Child Neurol. — 2018. — Vol. 60. — P. 19-29.

339. Stratton, K.R. Electroconvulsive treatment induces a rapid and transient increase in tyrosine phosphorylation of a 40-kilodalton protein associated with microtubule-associated protein 2 kinase activity[Текст] / K.R. Stratton, P.F. Worley, J.S. Litz, S.J. Parsons, R.L. Huganir, J.M. Baraban // J Neurochem. — 1991. — Vol. 56.—№ 1. — P. 147-152.

340. Sun, W. In vivo evidence for dopamine-mediated internalization of D2-receptors after amphetamine: differential findings with [3H]raclopride versus [3H]spiperone [Текст] / W. Sun, N. Ginovart, F. Ko, P. Seeman, S. Kapur // Mol Pharmacol. — 2003.—№63(2).—P. 456-462.

341. Surmeier, D.J. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons [Текст] / D.J. Surmeier, J. Ding, M. Day, Z. Wang, W. Shen // Trends in Neurosciences. — 2007. — V. 30. — №5. — P. 228-235.

342. Symonds, J.D. Advances in epilepsy gene discovery and implications for epilepsy diagnosis and treatment [Текст] / J.D. Symonds, S.M. Zuberi, M.R. Johnson // Curr Opin Neurol. — 2017. — Vol. 30. — № 2. — P. 193-199.

343. Szucs A. The risk of paradoxical Levetiracetam effect is increased in mentally retarded patients. [Текст] / A. Szucs, Z. Clemens, R. Jakus, G. Rasonyi, D. Fabo, D. Hollo, G. Barcs, A. Kelemen and J. Janszky // Epilepsia. — 2008. — V.49(7). — P.1174–1179.

344. Takeda, A.Elimination of zinc-65 from the brain under kainate-induced seizures [Текст] / A. Takeda, M. Hirate, N. Oku // Biometals. — 2004. — Vol. 17. — № 2. — P.141-144.

345. Tao, X. Ca2+ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism [Текст] / X. Tao, S. Finkbeiner, D.B. Arnold, A.J. Shaywitz, M.E. Greenberg // Neuron. — 1998.—№ 4.—P.709-726.

346. Thompson, P.J. Epilepsy: a clinical psychologists handbook [Текст] / P.J. Thompson, C. Cull, L. Goldstein // London: Routlege. — 1997. — P. 143-152.

347. Tomotaka, T. Post-stroke epilepsy [Текст] / T. Tomotaka, M. Ihara // Neurochemistry International. — 2017. — Vol. 107. — P. 219-228.

348. Trimble, M.R. On the use of tranquillisers in epilepsy [Текст] / M.R. Trimble // Epilepsia. — 2002. — Vol. 43. — № 2. — P. 25-27.

349. Trimble, M.R. Seizures, affective disorders and anticonvulsant drugs [Текст] / M.R. Trimble, B. Schmitz // Guildford. — 2002. — P. 199.

350. Trojnar, M. K. Neuroprotective effects of antiepileptic drugs [Текст] / M. K. Trojnar, R. Malek, M. Chroscinska, S. Nowak, B. Blaszczyk, S. J. Czuczwar, M. Y. Neufeld // Polish journal of pharmacology. — 2002. — Vol. 54. — №. 6. — P. 557-566.

351. Turner, T.J. Recent advances in gene therapy for neurodevelopmental disorders with epilepsy [Текст] / T.J. Turner, C. Zourray, S. Schorge, G. Lignani // J Neurochem. — 2021. — Vol. 157. — № 2. — P. 229-262.

352. Ursini, F. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4 [Текст] / F. Ursini, M. Maiorino // Free Radic Biol Med. — 2020. — Vol. 152 — P. 175-185.

353. Van der Zee, C.E. Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats [Текст] / C.E. Van der Zee, K. Rashid, K. Le, K.A. Moore, J. Stanisz, J. Diamond, R.J. Racine, M. Fahnestock // J. Neurosci. — 1995. — Vol. 15. — № 7. — P. 5316-5323.

354. Van Loo, K.M. Zinc regulates a key transcriptional pathway for epileptogenesis via metal-regulatory transcription factor 1 [Текст] / K.M. Van Loo, C. Schaub, J. Pitsch, R. Kulbida, T. Opitz, D. Ekstein, A. Dalal, H. Urbach, H. Beck, Y. Yaari, S. Schoch, A.J. Becker // Nat Commun. — 2015. — Vol. 26. — № 6. — P. 8688.

355. Van Vliet, E.A. Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy [Текст] / E.A. Van Vliet, E. Aronica, J.A. Gorter // Semin Cell Dev Biol. — 2015. — Vol. 38. — P. 26-34.

356. Vermeulen, J. Cognitive side-effects of chronic antiepileptic drug treatment: a review of 25 years of research [Текст] / J. Vermeulen, A.P. Aldenkamp // Epilepsy Res. — 1995. — Vol. 22. — № 2. — P. 65-95.

357. Vezzani, A. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy [Текст] / A. Vezzani, S. Balosso, T. Ravizza // Nat Rev Neurol. — 2019. — Vol. 15. — № 8. — P. 459-472.

358. Vezzani, A. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy [Текст] / A. Vezzani, T.Z. Baram // Epilepsy currents. — 2007. — Vol.7. — №. 2. — P. 45-50.

359. Vezzani, A. The role of inflammation in epilepsy [Текст] / A. Vezzani, J. French, T. Bartfai, T.Z. Baram // Nat Rev Neurol. — 2011 — Vol. 7. — № 1. — P. 31-40.

360. Vorhees C.V. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [Текст] / C.V Vorhees, M.T. Williams // Nat. Protoc. — 2006. — V. 1(2). — P. 848-858.

361. Walton, N.Y. Experimental secondarily generalized convulsive status epilepticus induced by d,l-homocysteine thiolactone [Текст] / N.Y. Walton, D.M. Treiman // Epilepsy Res. — 1988. –2. — P. 79-86.

362. Wang X, Zhong P, Gu Z, Yan Z. Regulation of NMDA receptors by dopamine D4 signaling in prefrontal cortex [Текст] / X. Wang, P. Zhong, Z. Gu, Z. Yan // Journal of Neuroscience. 2003; 23:9852–9861

363. Watanabe, Y. Participation of metabotropic glutamate receptors in pentetrazol-induced kindled seizure [Текст] / Y. Watanabe, Y. Kaida, S. Fukuhara, K. Takechi, T. Uehara, C. Kamei // Epilepsia. — 2011. — Vol. 52. — № 1. — P. 140-150.

364. WHO | Epilepsy: a public health imperative [Текст] // WHO. World Health Organization, 2019.

365. Wong, M. A. Critical review of mTOR inhibitors and epilepsy: from basic science to clinical trials [Текст] / M. A. Wong, // Expert Rev Neurother. — 2013. — Vol. 13. — № 6. — P. 657-669.

366. Wozny, C. Comment on “On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro” [Текст] / Wozny C, Kivi A, Lehmann TN, Dehnicke C, Heinemann U, Behr J // *Science.* — 2003/ — Vol. 301. — P. 463.

367. Xiong, Z.G. Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases [Текст] / Z.G. Xiong, G. Pignataro, M. Li, S.Y. Chang, R.P. Simon // Curr Opin Pharmacol. — 2008. — Vol. 8. — № 1. — P. 25-32.

368. Yakushev, I.Y. In vivo imaging of dopamine receptors in a model of temporal lobe epilepsy [Текст] / I.Y. Yakushev, E. Dupont, H.G. Buchholz, J. Tillmanns, F. Debus, P. Cumming, A.

Heimann, A. Fellgiebel, H.J. Luhmann, C. Landvogt, K.J. Werhahn, M. Schreckenberger, H. Potschka, P. Bartenstein // Epilepsia. 2010. — V. 51. — №3. — P. 415-422.

369. Yao, L. Dopamine and ethanol cause translocation of epsilonPKC associated with epsilonRACK: cross-talk between cAMP-dependent protein kinase A and protein kinase C signaling pathways [Текст] / L. Yao, P. Fan, Z. Jiang, A. Gordon, D. Mochly-Rosen, I. Diamond // Mol. Pharmacol. — 2008. — Vol. 73. — P. 1105-1112.

370. Ye, Y. Altered hippocampal myelinated fiber integrity in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: a histopathological and stereological investigation [Текст] / Y. Ye, J. Xiong, J. Hu, M. Kong, L. Cheng, H. Chen, T. Li, L. Jiang // Brain Res. — 2013. — Vol. 1522. — P. 76-87.

371. Youn, Y. The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1β, IL-1Ra, IL-8, and IL-10 [Текст] / Y. Youn, I.K. Sung, I.G. Lee // Korean journal of pediatrics. — 2013. — Vol. 56. — №. 7. — P. 271.

372. Younas, A. Dyke-Davidoff-Masson Syndrome: A Case Report and Review of Literature [Текст] / A. Younas, M. Saim, H. Maqsood, S. Younus, M. Hassan Raza // Cureus. — 2020. — Vol. 12. — № 12. — P. 11919.

373. Yuen, E.Y. Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism [Текст] / E.Y. Yuen, Q. Jiang, P. Chen, Z. Gu, J. Feng, Z. Yan // J Neurosci. — 2005. — Vol. 25. — P. 5488-5501.

374. Yuksel, A. Erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children with valproate and carbamazepine monotherapy [Текст] / A. Yuksel, M. Cengiz, M. Seven, T. Ulutin // J Basic Clin Physiol Pharmacol. — 2000. — Vol. 11. — № 1. — P. 73-81.

375. Zhang, L. Gene therapy in epilepsy [Текст] / L. Zhang, Y. Wang // Biomed Pharmacother. — 2021. — Vol. 143. — P. 112075.

376. Zhang, L.L. Side effects of phenobarbital in epilepsy: a systematic review [Текст] / L.L. Zhang, L.N. Zeng, Y.P. Li // Epileptic Disord. — 2011. — Vol. 13. — № 4. — P. 349-365.

377. Zhao, H. Emerging roles of Na+/H+ exchangers in epilepsy and developmental brain disorders [Текст] / H. Zhao, K.E. Carney, L. Falgoust, J.W. Pan, D. Sun, Z. Zhang // Prog Neurobiol. — 2016. — № 138. — Vol. 140. — P. 19-35.

378. Zhao, Y. The progress of epilepsy after stroke [Текст] / Y. Zhao, X. Li, K. Zhang, T. Tong, R. Cui // Current neuropharmacology. — 2018. — Vol. 16. — №. 1. — P. 71-78.

379. Zhu, X. Decreased CREB levels suppress epilepsy [Текст] / X. Zhu, X. Han, J.A. Blendy, B.E. Porter // Neurobiol Dis. — 2012. — Vol. 45. — № 1. — P. 253-263.

380. Zimmer, T.S. Seizure-mediated iron accumulation and dysregulated iron metabolism after status epilepticus and in temporal lobe epilepsy [Текст] / T.S. Zimmer, B. David, D.W.M.

Broekaart, M. Schidlowski, G. Ruffolo, A. Korotkov, N.N. Van der Wel, P.C. Van Rijen, A. Mühlebner, W. Van Hecke, J.C. Baayen, S. Idema, L. François, J. Van Eyll, S. Dedeurwaerdere, H.W. Kessels, R. Surges, T. Rüber, J.A. Gorter, J.D. Mills, E.A. Van Vliet, E. Aronica // Acta Neuropathologica. — 2021. — Vol. 142. — № 4. — P. 729-759.

381. Zimmern, V. Status Epilepticus in Children [Текст] / V. Zimmern, C. Korff // Journal of Clinical Neurophysiology. — 2020. — Vol. 37. — № 5. — P. 429-433.