

ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПАВЛЮК ІВАН ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 616.89-008.441.3; 616.89-008.441.3-036.1-099-047.58

ДИСЕРТАЦІЯ
НЕЙРОПРОТЕКТИВНА ДІЯ СПОЛУК L-ЛІЗИНУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ
АЛКОГОЛІЗМІ

14.03.05 – фармакологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

І. В. Павлюк

Науковий керівник: Беленічев Ігор Федорович, доктор біологічних наук,
професор

АНОТАЦІЯ

Павлюк І. В. Нейропротективна дія сполук L-лізину при хронічному алкоголізмі - кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Запорізький Державний медичний університет, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ України», Київ, 2018.

У розділі 1 проаналізовано дані наукової літератури щодо рівня алкоголізації населення в різних країнах світу й, у тому числі, в Україні та наслідків хронічного зловживання алкоголю. Проведено аналіз стану сучасних нейропротекторів. Обґрунтовано перспективність вивчення нейропротективної активності сполук L-лізину в умовах гострої і хронічної алкогольної інтоксикації.

Розділ 2 присвячено опису характеристик об'єктів і методів дослідження, наведено матеріали та обладнання, які були використані при виконанні експериментальної частини дисертаційної роботи.

Розділ 3 присвячений дослідженню похідних L-лізину. Які проявляють, в різного ступеня вираженості, нейропротективну дію в умовах ГАІ. Нейропротективна дія у сполук L-лізину направлена на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій (тварини швидше реагували на звукові та тактильні подразники, переверталися на живіт, починали самотійно пересуватися), а також на гальмування оксидативного стресу. За силою нейропротективної дії два похідних L-лізину - (S) -2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) і N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид достовірно перевершують ефективність мілдронату, а два похідних - L-лізину ессцінат і L-лізину гідрохлорид - можна порівняти з ним. Найбільш активним серед всіх досліджуваних сполук є Ангіолін. Одноразове введення Ангіоліну тваринам з ГАІ в лікувальному і, особливо, в профілактичному режимі призводить до відновлення орієнтовно-дослідницької активності і підвищує

щільність нейронів СА1-зони гіпокампу, збільшує вміст в них РНК і знижує кількість нейронів з ознаками апоптозу. На моделі ГАІ встановлена ефективна доза Ангіоліну при внутрішньошлунковому введенні 100 мг/кг і його ЛД₅₀ при внутрішньошлунковому введенні щурам - 15000 мг/кг та мишам - 10309 мг/кг. Отримані результати експериментально обґрунтовують перспективність подальших досліджень нейропротективних властивостей Ангіоліну при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації.

У розділі 4 наведені результати досліджень при моделюванні ХАІ, яке призводило до стійких порушень ЦНС у експериментальних тварин: пригнічувалась орієнтовно-дослідницька активність, погіршувалися когнітивно-мнестичні функції, також у тварин реєстрували агресивність, тривожність і неврологічні порушення. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково як протягом 14 діб після 30-денної ХАІ, так і, особливо, при паралельному формуванні модельної патології, призводило до нормалізації орієнтовно-дослідницької активності, збереження пам'ятного сліду в тесті УРПУ. Ангіолін значно зменшував прояви неврологічних порушень у алкоголізованих тварин: тремор, ригідність хвоста, хаотичні рухи в клітці, птоз, гіперактивність, судомні скорочення м'язів з перших днів лікування, а також надавав анксиолітичну дію. Так, Ангіолін збільшував кількість горизонтальних рухів на 321% і 347%, вертикальних – на 211% і 304%, обстежень отворів на 151% і 368%, збільшував латентний період УРПУ на 134-928 %%, знижував неврологічний дефіцит (на 3-4,5 балів за McGraw) ($p \leq 0,05$). Подібна дія Ангіоліну забезпечується дією молекули L-лізину, що входить до його складу, який підвищує афінність ГАМК рецепторів, обмежує глутаматну ексайтотоксичність, збільшує концентрацію ГАМК в нейронах неокортексу, гіпокампу і лімбічної системи і має протисудомну, анксиолітичну та седативну дію. По збільшенню кількості горизонтальних рухів і дослідження отворів, регресу неврологічного дефіциту, а також по збереженню умовного рефлексу Ангіолін переважає ($p \leq 0,05$) Мілдронат. Хронічна алкоголізація приводила до гіперпродукції АФК

і NO, гальмування активності антиоксидантних ферментів СОД і каталази і формування оксидативного стресу, накопичення продуктів окисної модифікації білків - АФГ і КФГ в головному мозку експериментальних тварин. Ангіолін виявляв значний антиоксидантний ефект при лікувальному і профілактичному режимі введення в умовах ХАІ.

Ангіолін знижував рівень маркерів оксидативного стресу - АФГ і КФГ на 32% і 36% й 46% і 43%, на фоні підвищення активності СОД на 160% 168% і каталази на 248%, 271% по відношенню до контролю ($p \leq 0,05$). Антиоксидантні ефекти Ангіоліну забезпечуються наявністю в його структурі 3-метил-1,2,4-триазоліл-тіоацета, який є скавенджером кисневих радикалів і цитотоксичних дериватів NO, здатністю гальмувати утворення АФК в глутамат-кальцієвому каскаді і в біоенергетичних системах мітохондрій, а також регулювати експресію СОД. Відомо, що нейрони з дефіцитом СОД менш стійкі до гіпоксії, підвищених концентрацій глутамату, АФК і NO. Антиоксидантний механізм нейропротективної дії Ангіоліну по всій видимості є одним з найважливіших, тому що оксидативний стрес відіграє роль першого плану в нейродеструкції, викликаній алкогольною інтоксикацією. За вираженістю антиоксидантної дії Ангіолін достовірно перевершує Мілдронат. Моделювання ХАІ викликає стійкі порушення в системі NO головного мозку: значне підвищення активності NOS, виснаження запасів L-аргініну, гіперпродукції NO і підвищення в 8-9 разів концентрації маркеру нітрозуючого стресу - нітротирозину. Хронічна алкоголізація приводить до підвищення експресії: на 1-4 добу мРНК pNOS, pNOS, а потім мРНК iNOS, iNOS, підвищенню активності цього ферменту, і до утворення значної кількості цитотоксичних метаболітів NO. Ангіолін нормалізує основні показники нітроксидергічної системи головного мозку щурів з ХАІ і гальмує нітрозуючий стрес. Так, Ангіолін знижує активність NOS, знижує вміст стабільних метаболітів NO на 54% і 67%, підвищує концентрацію L-аргініну на 289%, 101% і знижує рівень маркера оксидативного стресу - нітротирозину в плазмі крові на 60% і 73% й

головному мозку на 67,2 % і 73% ($p \leq 0,05$). Гіперпродукція NO і накопичення його цитотоксичних дериватів призводить до нітрозолування антиапоптичних білків bcl-2, знижуючи їх функції, а також підсилює синтез проапоптичних білків FAS і APO-1. Відомо, що Ангіолін захищає NO від АФК, запобігаючи його перетворенню в пероксин, тим самим перериваючи реакції нітрузуючого стресу.

Моделювання ХАІ викликає стійкі порушення енергетичного метаболізму головного мозку експериментальних тварин - енергетичного дефіциту, гальмування реакцій циклу Кребса і активації анаеробного гліколізу. Так, в головному мозку тварин контрольної групи реєстрували достовірне зниження АТФ і АДФ на фоні збільшення АМФ, підвищення рівня лактату і зниження рівня малату й пірувату. Етанол-залежний трансміттерний аутокоідоз, оксидативний і нітрузуючий стреси при хронічній алкоголізації приводять до пошкодження мембран мітохондрій, нітрозолування SH-груп білків мітохондріальної пори призводять до формування вторинної мітохондріальної дисфункції і енергетичного дефіциту нейронів головного мозку. Призначення тваринам з ХАІ в лікувальному і профілактичному режимі Ангіоліну призводило до зниження енергетичного дефіциту за рахунок посилення аеробної продукції макроергів і зниження анаеробного гліколізу. Так, у тварин з ХАІ, які отримували Ангіолін відбувалося підвищення в головному мозку АТФ на 80%, 97%, АДФ на 20%, 19%, зниження АМФ на 12%, 35%, підвищення малату на 73%, 82% і пірувату на 33%, 31% і зниження лактату на 50%, 49% в порівнянні з групою контролю ($p \leq 0,05$). Ангіолін за впливом на досліджувані показники енергетичного обміну перевершує Мілдронат ($p \leq 0,05$). Механізм дії Ангіоліну на енергетичний обмін обумовлений здатністю його структурного фрагмента - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацета обмежувати розвиток мітохондріальної дисфункції і активувати компенсаторні шунти продукції енергії, зокрема малат-аспартатний. Моделювання ХАІ призводило до підвищення активності ГДК і ГАМК-Т, а також зниження глутамату, ГАМК

та гліцину в головному мозку. Курсове введення Ангіоліну тваринам з ХАІ призводило до підвищення ГАМК на 157% і 119%, глутамату на 112% і 50% і гліцину на 50% й 55% і зниження активності ГДК на 17% й 13% і ГАМК-Т на 32%, 32% по відношенню до контролю ($p \leq 0,05$). У крові хворих на алкогольну залежність, а також в неокортексі щурів з хронічною алкоголізацією виявлено значний дефіцит ГАМК і гліцину на тлі високої тривожності, депресії, агресивності, поведінкових порушень. Мілдронат не проявляв достовірного впливу на показники ГАМК-ергічної системи головного мозку. Моделювання ХАІ призводить до пошкодження нейронів CA1 зони гіпокампу - зниження щільності та площі нейронів, зменшення в них концентрації РНК і значного збільшення апоптично змінених нейронів. Також було виявлено зниження концентрації в нейронах bcl-2. В основі пошкодження нейронів при хронічному алкоголізмі лежить етанол-індукована ексайтотоксичність, підвищена продукція NO на фоні експресії iNOS, активації оксидативного стресу, зниження рівня антиапоптичних білків і, в кінцевому підсумку, активації нейроапоптозу.

Введення тваринам з ХАІ Ангіоліну призводило до підвищення щільності нейронів CA1-гіпокампу на 49,3% і 57%, їх площі на 36% і 45%, збільшення в них вмісту РНК на 64% й 77% і зниження щільності апоптично змінених клітин на 38%, 51% щодо контролю ($p \leq 0,05$). Ангіолін також збільшував вміст в нейронах bcl-2 на 460% й 311% ($p \leq 0,05$) щодо контролю. ХАІ приводила до зниження щільності та площі гліальних клітин CA1-гіпокампу і зниження в них РНК. Ангіолін підвищував щільність гліальних клітин на 38,7% і 23,2%, їх площі на 36% і 37% і підвищував концентрацію в них РНК на 61% і 86% в порівнянні з групою контролю ($p \leq 0,05$). Ангіолін за впливом на досліджувані морфо-функціональні показники нейронів і гліальних клітин CA1-гіпокампу перевершує Мілдронат ($p \leq 0,05$). Введення Ангіоліну тваринам після моделювання ХАІ надавало протективний ефект на ендотелій капілярів IV-V шарів кори і стінки судин головного мозку, що проявлялося збільшенням щільності ядер ендотеліоцитів на 38% й 42%,

площі ядер на 21% і 22% і підвищенням в них концентрації РНК на 37% і 41%, збільшенням щільності проліферуючих ендотеліоцитів на 47% і 142% і підвищенням експресії VEGF на 88% і 367% в порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$). VEGF являє собою гіпоксично індукований ангіогенний пептид з нейротрофічними ефектами. Тому, фармакологічна модуляція експресії VEGF є перспективним напрямком нейропротекції. Мілдронат не впливав на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів капілярів і стінки судин головного мозку. Отримані результати свідчать про те, що ендотеліопротективна дія Ангіоліну може бути важливою ланкою його нейропротективної дії в умовах ХАІ.

Розділ 5 присвячений аналізу отриманих результатів. На підставі проведених досліджень було виявлено сполуку L-лізину – (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) з найбільш вираженою нейропротективною дією в умовах алкогольної інтоксикації. Нейропротективна дія Ангіоліну в умовах ХАІ спрямована на гальмування оксидативного і нітрозативного стресу, нормалізацію енергетичного метаболізму головного мозку, гальмування нейроапоптозу в CA1-гіпокампі та активацію експресії bcl-2, протекцію ендотеліоцитів судин головного мозку та підвищення експресії VEGF, що, в підсумку, призводить до поліпшення неврологічного статусу і поведінкових реакцій експериментальних тварин. Механізм цієї дії обумовлений здатністю метаболіту L-лізину - піпеколієвої кислоти обмежувати трансміттерний аутокоідоз і властивостями 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату активувати компенсаторні мітохондріальні-цитозольні шунти енергії, інактивувати цитотоксичні форми NO, гальмувати NO-залежний механізм нейроапоптозу і підвищувати біодоступність цього трансмітера; також за рахунок антиоксидантних властивостей Ангіолін здатний впливати на АФК- і SH-SS-залежні механізми Red / Oxi регуляції і транскрипції, що може призводити до підвищення експресії VEGF і ряду цитопротективних білків.

Ключові слова: алкогольна інтоксикація, нейропротекція, L-лізину гідрохлорид, L-лізину есцинат, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, нейроапоптоз, оксидативний та нітрозуючий стрес, VEGF, bcl-2.

SUMMARY

Pavlyuk I. V. Neuroprotective action of L-lysine derivatives in chronic alcoholism - qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences majoring in 14.03.05 - pharmacology. – Zaporizhia State Medical University, State Institution “Institute of Pharmacology and Toxicology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kiev, 2018.

Section 1 analyzes the scientific literature data on the level of alcohol abuse in post-Soviet countries and, in particular, in Ukraine and the consequences of chronic alcohol abuse. The analysis of the state of modern neuroprotectors was carried out. The prospect of study of neuroprotective activity of L-lysine compounds under acute and chronic alcohol intoxication is substantiated.

Section 2 is devoted to the description of the characteristics of objects and study methods, provided materials and equipment that were used in the implementation of the experimental part of thesis paper.

Section 3 is devoted to the study of L-lysine derivatives. They exhibit, in varying degrees of severity, neuroprotective action under acute alcohol intoxication (AAI). Neuroprotective action in L-lysine compounds is aimed at reduction of neurological disorders, restoration of behavioral reactions (animals reacted faster to sound stimuli, taking them into hands, turned over to the stomach, started to move independently), as well as inhibition of oxidative stress. According to the level of neuroprotective action, two L-lysine derivatives - (S) -2,6-diaminohexanoic acid 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate (angiolin) and N⁶-(1-iminoethyl) L-lysine dihydrochloride significantly exceed the efficiency of mildronate, and two derivatives - L-lysine escinate and L-lysine hydrochloride -

can be compared with it. Angiolin is the most active among all studied compounds. The single administration of Angiolin to animals with AAI in the treatment and, especially in the prophylactic mode, leads to the restoration of orienting-exploratory activity and increases neurons density of CA1-hippocampus zone, increases the content of RNA in them and reduces the number of neurons with signs of apoptosis. An effective dose of Angiolin in intragastric administration of 100 mg/kg and its LD₅₀ in intragastric administration to rats - 15000 mg/kg and mice - 10309 mg/kg was determined under AAI. The obtained results experimentally substantiate the perspective of further studies of Angiolin neuroprotective properties in the modeling of chronic alcohol intoxication.

Section 4 presents the study results of CAI modeling that led to persistent CNS disorders in experimental animals - the orienting-exploratory activity was suppressed, cognitive-mnemonic functions were deteriorated, and aggressiveness, anxiety and neurological disorders were registered in animals. Course administration of Angiolin intragastrically both within 14 days after the 30-day CAI, and, especially, in parallel formation of the model pathology, led to the normalization of the orienting-research activity, the preservation of a memorable trace in the Conditionally reflexive passive avoidance test (CRPA). Angiolin significantly reduced the manifestations of neurologic disorders in alcoholized animals: tremor, tail rigidity, chaotic movements in the cell, ptosis, hyperactivity, convulsive muscle contractions from the first days of treatment, and also had an anxiolytic effect. Thus, Angiolin increased the number of horizontal movements by 321% and 347%, the vertical ones by 211% and 304%, the apertures - by 151% and 368%, increased the latent period of CRPA by 134-928%, reduced the neurological deficit (by 3- 4.5 points for McGraw) ($p \leq 0.05$). This action of Angiolin is provided by the action of L-lysine molecule in its composition, which increases the affinity of GABA receptors, limits glutamate excitotoxicity, increases the concentration of GABA in the neocortex neurons, the hippocampus and the limbic system and has anticonvulsant, anxiolytic and sedative effects. Angiolin exceeds ($p \leq 0.05$) Mildronate by increased number of horizontal movements and

the study of holes, regression of neurological deficiency, as well as maintenance of conditional reflex. Chronic alcoholization led to AOS and NO overproduction, inhibition of the activity of SOD antioxidant enzymes and catalase and formation of oxidative stress, accumulation of proteins oxidative modification products - AFH (adelhydfenihydrazones) and KPH (ketophenylhydrazones) in the brain of experimental animals. Angiolin exhibited a significant antioxidant effect in the treatment and prophylactic mode of administration underCAI.

Angiolin reduced the level of oxidative stress markers - AFH and KPH by 32% and 36% and 46% and 43%, with an increase in SOD activity by 160% 168% and catalase by 248%, 271% relative to control ($p \leq 0, 05$). Antioxidant effects of Angiolin are ensured by the presence of 3-methyl-1,2,4-triazolyl-thioacetatein its structure, which is a scavenger of oxygen radicals and NO cytotoxic derivatives, with the ability to inhibit AOS formation in the glutamate-calcium cascade and in bioenergetic systems of mitochondria, as well as to regulate SOD expression. It is known that SOD deficiency neurons are less resistant to hypoxia, increased concentrations of glutamate, AOS and NO. The antioxidant mechanism of neuroprotective action of Angiolin seems to be one of the most important, as oxidative stress plays the role of the first plan in neurodegradation caused by alcohol intoxication. Angiolin significantly exceeds Mildronateby the severity of antioxidant action. The CAI modeling causes persistent violations in the brain's NO system: a significant increase in NOS activity, depletion of L-arginine stocks, NO hyperproduction, and an 8-9-fold increase in concentration of nitrosating stress marker - nitrotyrosine. Chronic alcoholization leads to increased expression: for 1-4 days mRNAs nNOS, nNOS, and then mRNA iNOS, iNOS, increased activity of this enzyme, and to the formation of a significant number of cytotoxic NO metabolites. Angiolin normalizes the main indicators of the nitroxidergic system of the brain of rats with CAI and inhibits nitrosating stress. Thus, Angiolin reduces NOS activity, the content of NO stable metabolites by 54% and 67%, increases L-arginine concentration by 289% 101% and reduces the level of oxidativestress marker - nitrotyrosine in blood plasma by 60% and 73% and the brain by 67.2%

and 73% ($p \leq 0.05$). The NO hyperproduction and the accumulation of its cytotoxic derivatives leads to nitrosylation of bcl-2 anti-apoptotic proteins reducing their functions, and also enhances the synthesis of FAS and APO-1 proapoptotic proteins. It is known that Angiolin protects NO from AOS, preventing it from being converted into peroxyn, thereby interrupting the reactions of nitrosating stress.

The CAI modeling causes persistent violations of the energy metabolism of the brain of experimental animals - energy deficiency, inhibition of Krebs cycle reactions and activation of anaerobic glycolysis. Thus a significant decrease in ATP and ADP against the background of an increase in AMF, an increase in lactate levels and a decrease in the level of malate and pyruvate were registered in the brain of the control animals. Ethanol dependent transmitter autotoxicity, oxidative and nitrosating stress in chronic alcoholization cause damage of mitochondria membranes, nitrosylation of SH-groups of proteins of mitochondrial pores lead to the formation of secondary mitochondrial dysfunction and energy deficit of brain neurons. The administration of Angiolin to animals with CAI in the treatment and prophylactic mode resulted in a decrease in energy deficit due to increased aerobic macroenergy production and anaerobic glycolysis. Thus ATP in the brain was increased by 80%, 97%, ADP by 20%, 19%, AMP was decreased by 12%, 35%, malate was increased by 73%, 82%, and pyruvate – by 33%, 31% and lactate was decreased by 50%, 49% in animals with CAI, which received Angiolin in comparison with the control group ($p \leq 0.05$). Angiolin exceeds Mildronate ($p \leq 0.05$) on influences on the studied parameters of energy metabolism. The Angiolin mechanism of action on energy metabolism is determined by the ability of its structural fragment - 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate to limit the development of mitochondrial dysfunction and activate compensatory shunts of energy products, in particular, malate-aspartate. The CAI modeling resulted in an increase in GAD (glutamic acid decarboxylase) and GABA-T activity, as well as in glutamate, GABA and glycine reduction in the brain. The course administration of Angiolin to animals with CAI resulted in an increase of GABA by 157% 119%, glutamate - by 112%, 50%, and glycine - by 50% by 55%, and a decrease in the

activity of GAD by 17% 13% and GABA by 32%, 32% in relation to control group ($p \leq 0.05$). In the blood of rats with alcohol addiction, as well as in the neocortex of rats with chronic alcoholization, a significant deficiency of GABA and glycine was observed against the background of high anxiety, depression, aggressiveness, behavioral disorders. Mildronate did not show a significant effect on GABA system of the brain. The CAI modeling results in damage of CA1 neurons of the hippocampal zone-decrease of neurons density and area, reduction of RNA concentration in them, and a significant increase of apoptotic altered neurons. Also, decrease of bcl-2 neurons concentration was observed. The basis of damage to neurons in chronic alcoholism is ethanol-induced excitotoxicity, elevated NO production against the background of express iNOS, activation of oxidative stress, decrease in the level of antiapoptotic proteins and, ultimately, activation of neuroapoptosis.

Administration of Angiolinto animals with CAI resulted in an increase of density of CA1-hippocampus neurons by 49.3% and 57%, their area - by 36% and 45%, an increase of RNA content in them - by 64% 77%, and a decrease of apoptotic cells density by 38%, 51% for control group ($p \leq 0.05$). Angiolin also increased the bcl-2 content in the neurons by 460% 311% ($p \leq 0.05$) for control group. CAI led to decrease of density and area of CA1-hippocampus glial cells and decrease of their RNA. Angiolin increased the density of glial cells by 38.7% and 23.2%, their area - by 36% and 37%, and increased the RNA concentration in them by 61% and 86% in comparison with the control group ($p \leq 0.05$). Angiolin exceedsMildronate on influences of studied morpho-functional parameters of neurons and glial cells of the CA1-hippocampus($p \leq 0.05$). Administration of Angiolin to animals after CAI modeling providedprotective effect on the endothelium of IV-V capillaries of cortex layers and walls of vessels of the brain, which was manifested by an increase in the density of nuclei of endothelial cells by 38% 42%, the area of nuclei - by 21% and 22%, and an increase of their RNA concentration by 37% and 41%, an increase in the density of proliferating endothelial cells by 47% and 142%, increase of VEGF expression by 88% and

367% in comparison with control ($p \leq 0.05$). VEGF is a hypoxic-induced angiogenic peptide with neurotrophic effects. Therefore, the pharmacological modulation of VEGF expression is a promising direction of neuroprotection. Mildronate did not affect the morpho-functional parameters of endothelial cells of the capillaries and the walls of vessels of the brain. The obtained results indicate that the endothelioprotective action of Angiolin can be an important link in its neuroprotective action under CAI.

Section 5 is devoted to the analysis of the results. A compound of L-lysine-(S)-2,6-diaminohexanoic acid 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate (Angiolin) with the most pronounced neuroprotective effect under alcoholic intoxication was registered on the basis of studies. The neuroprotective action of Angiolin under CAI is aimed at inhibition of oxidative and nitrosating stress, normalization of energy metabolism of the brain, inhibition of neuroapoptosis in the CA1-hippocampus and activation of bcl-2 expression, protection of endothelial cells of the brain vessels and increase of VEGF expression, which ultimately leads to improvement of neurological status and behavioral reactions of experimental animals. The mechanism of this action derived from the ability of metabolite of L-lysine-pipecolic acid to limit transmitting autacoidoses and ability of 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate to activate compensatory mitochondrial-cytosolic energy shunts, to inactivate cytotoxic NO forms, to inhibit NO-dependent mechanism of neuroapoptosis and increase the bioavailability of this transmitter (Mazur I. A., 2012; Belenichev I. F., 2015); also, due to the antioxidant properties Angiolin can affect AOS (active oxygen species)- and SH-SS-dependent mechanisms of Red/Oxi regulation and transcription (Chekman I.S., Mazur I.A., 2010), which may cause upregulation of VEGF and the number of cytoprotective proteins.

Key words: alcohol intoxication, neuroprotection, L-lysine hydrochloride, L-lysine aescinat, N⁶-(1-iminoethyl) L-lysine dihydrochloride, (S)-2,6-diaminohexanoic acid 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate, neuroapoptosis, oxidative and nitrosating stress, VEGF, bcl-2.

Список публікацій здобувача

1. Павлюк И. В. Влияние Ангиолина на морфо-функциональные показатели СА-1 зоны гиппокампа и процессы нейроапоптоза при моделировании хронической алкогольной интоксикации при лечебном режиме введения / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов, Л. И. Кучеренко // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал – 2016. – вип.1, Т.1(126). – С.130-136. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

2. Pavlyuk I. V. Antioxidant Modulation of NO-Dependent Mechanisms of Oxidative Stress Initiation in Brain of Rats Subjected to Chronic Alcohol Intoxication / I. V. Pavlyuk, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko // Biological Markers Guided Therapy. – NIKARI Ltd. – 2016. – Vol. 3, №1. – P. 177-184. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

3. Павлюк И. В. Сравнительная оценка нейропротективного действия производных L-лизина в условиях острой алкогольной интоксикации / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал. – 2016. – Вип.4, Т 1(133). – С. 117-122. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

4. Pavlyuk I. V. Pharmacological effects on oxidative stress NO-dependent mechanisms in the brain under chronic alcohol intoxication: Angiolin antioxidant effects/ I. V. Pavlyuk, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko // //American Scientific Journal. – 2016. – № 1(11). – P. 85-88 *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

5. Павлюк И. В. Фармакокоррекция последствий нейротоксических поражений при тяжелых формах острых отравлений этанолом / И. В.

Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, А. В. Абрамов // «Світ медицини та біології». – 2016. – №4 (58). – С. 93-98. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

6. Павлюк И. В. Фармакокоррекция Ангиолином нарушенный энергетического метаболизма в головном мозге крыс вследствие хронической алкогольной интоксикации / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко // «Світ медицини та біології». – 2017 – № 1 (59). – С. 90-94. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

7. Пат. 106867 Україна, МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01). Спосіб корекції неврологічних порушень при хронічній алкогольній інтоксикації. / І. В. Павлюк, І. Ф. Беленічев, О. О. Нагорна, Л. І. Кучеренко, М. О. Авраменко, І. А. Мазур; заявник ТОВ НВО «Фарматрон». – № а 2014 07033; заявл. 23.06.2014; опубл. 10.10.2014. Бюл. № 19. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних).*

8. Пат. 111462 Україна, МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01). Застосування (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату як активної основи лікарських засобів для профілактики та лікування порушень життєзабезпечуючих функцій ЦНС при важких формах гострого отруєння етанолом. / І. В. Павлюк, Л. І. Кучеренко, І. Ф. Беленічев, І. А. Мазур, О. С. Бідненко; заявник ТОВ НВО «Фарматрон». – № 2016 00367; заявл. 16.01.2016; опубл. 25.04.2016. Бюл. № 8. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних).*

9. Павлюк И. В. Создание метаболитотропных эндотелиопротекторов - фокус на «Ангиолин» / И. В. Павлюк, Н. В. Парнюк, О. И. Беленичева // Первая Всероссийская научно-практическая конференция

молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств», Москва, 3-5 июня 2013 г. – Москва, 2013. – С. 13.

10. Павлюк И. В. Молекулярные аспекты нейропротективного действия нового препарата «Ангиолин» при формировании хронической алкогольной интоксикации у крыс. / И. В. Павлюк // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2013 р. – Запоріжжя, 2013. – С. 30.

11. Павлюк И. В. Red/Ox – зависимые механизмы нейроапоптоза при депривации системного уровня восстановленного глутатиона *in vitro* HSP₇₀ – опосредованные нейропротективные свойства тиольного антиоксиданта «Ангиолин» / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур, Н. В. Парнюк, Н. В. Бухтиярова, Е. В. Однокоз // Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты. Международная конференция молодых ученых и I-V школа им. академика Н.М. Эмануэля 1-4 октября Москва 2013. – С. 272.

12. Павлюк И. В. Влияние Тиоцетама на показатели нитрозирующего стресса в головном мозге животных с хронической алкогольной интоксикацией / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур, Т. В. Кучер // Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» Сборник материалов конгресса. Москва 7-11 апреля 2014 г. Москва, 2014. – С. 206.

13. Павлюк И. В. Влияние Ангиолина на показатели митохондриальной дисфункции головного мозга у крыс после формирования хронической алкогольной интоксикации. / И. В. Павлюк // Тези доповідей «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» 12-13 травня 2016 р. – Запоріжжя, 2016. – С. 41.

14. Павлюк И. В. Профилактический и лечебный нейропротективные эффекты таблеток Ангиолин при курсовом введении животным с хронической алкогольной интоксикацией. / И. В. Павлюк, И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Т. Ю. Винниченко // V Національний з'їзд фармакологів України. 18-20 жовтня 2017 р. – Запоріжжя, 2017. – С. 84.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	22
Розділ 1. Огляд літератури. Сучасна стратегія нейропротекції при алкогольній хворобі.....	28
1.1. Клітинно-молекулярно-біологічні механізми алкогольної нейродеструкції.....	28
1.2. Нейропротектори в комплексній терапії алкогольного ураження головного мозку: класифікація, фармакологічна характеристика та перспективи подальших розробок.....	37
1.3. Похідні L-лізину – перспективні засоби нейропротекції при алкогольному ураженні головного мозку.....	48
Розділ 2. Матеріали і методи дослідження.....	56
2.1. Характеристика експериментальних тварин, які були використані в дослідженнях	56
2.2. Характеристика експериментальних моделей, які були використані в дослідженнях для оцінки нейропротективної активності досліджуваних препаратів	57
2.3. Обґрунтування вибору ефективної дози розчину таблеток «Ангіюлін»...60	60
2.4. Гістохімічні методи дослідження	61
2.5. Біохімічні методи дослідження.....	62
2.6. Морфологічні методи дослідження	65
2.7. Вестернблотінг	69
2.8. Фармакологічні методи	70
2.9. Токсикологічні методи	71
2.10. Статистичні методи дослідження	72
Розділ 3. Оцінка нейропротективної дії похідних L-лізину в умовах гострої алкогольної інтоксикації	73
3.1. Дослідження нейропротективної дії похідних L-лізину в умовах гострої алкогольної інтоксикації	73

3.2. Дослідження нейропротективної дії найбільш перспективної сполуки, похідної L- лізину - (S)-2,6 діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетата (Ангіоліну) на моделі гострої алкогольної інтоксикації при профілактичному і лікувальному режимі введення.....	81
3.3. Визначення ефективної терапевтичної дози таблеток «Ангіолін» на моделі гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ)	87
3.4. Вивчення гострої токсичності сполуки Ангіолін при інтрагастральному введенні	91
Висновки до розділу 3.....	93
Розділ 4. Нейропротективна і ендотеліопротективна дія таблеток «Ангіолін» при хронічній алкогольній інтоксикації під час лікувального і профілактичного режиму введення.....	95
4.1. Вплив Ангіоліну на неврологічні і когнітивні порушення у експериментальних тварин при хронічній алкогольній інтоксикації під час лікувального режиму введення.....	95
4.1.2. Вплив Ангіоліну на показники оксидативного і нітрозативного стресу в головному мозку при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації під час лікувального режиму введення.....	100
4.1.3. Вплив Ангіоліну на показники енергетичного метаболізму в головному мозкові при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації при лікувальному режимі введення	107
4.1.4. Вплив Ангіоліну на морфометричні показники СА-1 зони гіпокампу і процеси апоптозу при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації при лікувальному режимі введення	113
4.1.5. Вплив Ангіоліну на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів судин головного мозку	123
4.2. Експериментальне вивчення нейропротективних властивостей таблеток «Ангіолін» в умовах моделювання 30-денної хронічної алкогольної інтоксикації і одночасного введення препаратів	133
4.2.1. Вплив профілактичного введення Ангіоліну на неврологічний статус і	

когнітивно-мнестичні функції тварин при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації	133
4.2.2. Вплив профілактичного введення Ангіоліну на показники оксидативного і нітрозативного стресу в головному мозку при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації	138
4.2.3. Вплив профілактичного введення Ангіоліну на показники енергетичного метаболізму в головному мозку при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації	140
4.3. Вплив профілактичного введення Ангіоліну на морфометричні показники СА-1 зони гіпокампу і процеси апоптозу при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації	144
Висновки до розділу 4	150
Розділ 5. Аналіз та обговорення отриманих результатів	152
ВИСНОВКИ.....	171
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	173
ДОДАТКИ.....	216

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ	–	аденозиндифосфат
АМН	–	Академія медичних наук
АМФ	–	аденозинмонофосфат
АМПА	–	α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
АТФ	–	аденозинтрифосфат
АФГ	–	альдегідфенілгідрозон
АФК	–	активні форми кисню
ВООЗ	–	Всесвітня організація охорони здоров'я
ГАІ	–	гостра алкогольна інтоксикація
ГАМК	–	гамма-аміномасляна кислота
ГДК	–	глутаматдекарбоксилаза
ГК	–	гексокіназа
ГПР	–	глутатіонпероксидаза
ГР	–	глутатіонредуктаза
ДМФА	–	диметилформамід
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЗДМУ	–	Запорізький державний медичний університет
ЕД ₅₀	–	середня ефективна доза
ЕТА	–	ендотелін-1
ІТНП	–	індекс тяжкості неврологічних порушень
КФГ	–	кетондинітрофенілгідрозон
ЛД ₅₀	–	середньо смертельна доза
ЛДГ	–	лактатдегідрогеназа
МДА	–	малоновий діальдегід
МДГ	–	малатдегідрогеназа
МКХ	–	Міжнародна класифікація хвороб
НАДН	–	нікотинаміадаєніндинуклеотид
НАДФН	–	нікотинаміадаєніндинуклеотидфосфат

НСТ	–	нітросиній тетрозолій
ОМБ	–	окиснювальна модифікація білків
ООЩ	–	одиниці оптичної щільності
ПААГ	–	поліакриламідний гель
ПАР	–	психоактивна речовина
РНК	–	рибонуклеїнова кислота
СДГ	–	сукцинатдегідрогеназа
СОД	–	супероксиддисмутаза
УРПУ	–	умовна реакція пасивного уникнення
ХАІ	–	хронічна алкогольна інтоксикація
ЦНС	–	центральна нервова система
ЧМТ	–	черепно-мозкова травма
8-OHG	–	8-оксогуанін
Bcl-2	–	антиапоптичний білок
DHEA	–	дегідроепіандростерон
iNOS	–	індуцибельна синтаза оксиду азоту
PARP	–	полі(ADP-рибозо)полімераза
VEGF	–	фактор росту ендотелію

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Високий рівень алкоголізації населення в країнах пострадянського простору й, у тому числі, в Україні є причиною ранньої смертності працездатного населення. Поряд зі значною смертністю серйозним наслідком хронічного зловживання алкоголю є порушення функцій головного мозку, а нейротоксичні пошкодження етанолом істотно впливають на соціальний статус та якість життя цієї категорії хворих і є причиною їх інвалідизації. Тому дослідження молекулярно-біохімічних уражень головного мозку при інтоксикації етанолом та розробка нових підходів до нейропротекції визначає актуальність цього дослідження з можливістю використання отриманих результатів в клінічній практиці. На жаль, базові ноотропи і нейрометаболітні препарати (пірацетам, мілдронат, цитофлафін, солі бурштинової кислоти) не завжди надають очікуваний нейропротективний ефект при алкогольному захворюванні. Обнадійливі результати показали нейротрофічні церебропротектори (цереброкурін, кортексин, церебролізин) і нейрометаболічний церебропротектор Тіоцетам [66]. Відома роль глутаматергічної системи в механізмах глутамат-кальцієвого каскаду, оксидативного стресу та ініціації нейроаптозу і втрати когнітивно-мнестичних функцій. Останнім часом через призму нейропротекції розглядаються препарати, які модулюють активність таких трансмітерних систем головного мозку, як ГАМК-ергічні і глутаматергічні. На особливу увагу нейрофармакології заслуговує L-лізин і його похідні. L-лізин шляхом перетворення в піпеколієву кислоту підвищує афінність ГАМК бензодіазепін-рецепторного комплексу, знижує трансмітерний аутокоідоз і проявляє властивості ендогенного антиконвульсанта, нейропротектора і анксиолітика. Заслуговують на увагу і сполуки L-лізину - L-лізину гідрохлорид, L-лізину есцинат, N⁶- (1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид (селективний інгібітор iNOS), розроблений в НВО «Фарматрон» (Україна)

(S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, що проявляють нейропротективні властивості на моделях церебральної ішемії і інтрацеребрального крововиливу. Вищевикладене теоретично обґрунтовує перспективність вивчення нейропротективної активності сполук L-лізину в умовах гострої і хронічної алкогольної інтоксикації і визначає актуальність даної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP₇₀/HIF-1 α -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020).

Мета і задачі дослідження:

Мета дисертаційної роботи - оцінити нейропротективні властивості сполук L-лізину та на основі експериментально встановлених механізмів позитивного впливу найбільш активної сполуки на морфологічні, біохімічні і функціональні порушення головного мозку в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації обґрунтувати об'єктивні можливості її використання в якості ефективного засобу із зазначеною дією.

Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Виявити найбільш активну сполуку з нейропротективною активністю серед L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату під час гострої алкогольної інтоксикації та визначити її ED₅₀ та LD₅₀.

2. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на показники неврологічних порушень (за шкалою С.Р.МсGraw) і когнітивно-мнестичних порушень (тест УРПУ і відкрите поле) при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації.

3. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на морфо-функціональні характеристики нейронів СА-1-зони гіпокампа (площа, густина, вміст РНК нейронів та глії, вміст апоптично змінених нейронів і вміст Bcl_2) в умовах хронічної алкогольної інтоксикації.

4. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на показники оксидативного та нітрозуючого стресу (NOS, нітротирозин, стабільні метаболіти NO, СОД, каталаза, АФГ, КФГ) в умовах хронічної алкогольної інтоксикації.

5. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на показники енергообміну (АТФ, АДФ, АМФ, лактат, піруват, малат, ГАМК-шунт) в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації.

6. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів судин і капілярної сітки головного мозку (щільність, площа, вміст РНК і експресія VEGF) в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації.

Об'єкт дослідження: молекулярно-біохімічні і морфо-гістологічні порушення в головному мозку щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

Предмет дослідження: нейропротективна дія сполук L-лізину в умовах моделювання хронічної алкогольної інтоксикації.

Методи дослідження

З метою виконання поставлених задач у дисертаційній роботі використані фармакологічні, біохімічні, морфометричні, імуноферментні, гістоімунохімічні методи, а також методи математичної статистики і системного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів.

В дисертаційній роботі вперше отримані дані про нейропротективну активність сполук L-лізину - L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату на моделі гострої алкогольної інтоксикації; дію даного виду активності направлено на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій, а також на зниження оксидативного стресу і нейроапоптозу. Встановлено, що (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) за величиною нейропротективної дії перевершує досліджувані сполуки L-лізину і референс-препарат Мілдронат. Вперше на моделі хронічної алкогольної інтоксикації виявлена висока нейропротективна активність Ангіоліну при внутрішньошлунковому введенні, показано його перевагу при порівнянні з Мілдронатом. Встановлено, що Ангіолін при його лікувальному і профілактичному режимах введення в умовах хронічної алкогольної інтоксикації призводить до підвищення щільності ендотеліоцитів судин головного мозку, підвищення експресії ендотеліального фактора росту (VEGF), гальмування оксидативного стресу, підвищення аеробної продукції АТФ, підвищення щільності нейронів СА1-зони гіпокампа, гальмування нейроапоптозу, підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2, підвищення РНК в нейронах СА1-гіпокампа і, як наслідок, зменшення неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані результати експериментального дослідження нейропротективної дії (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-

триазоліл-5-тіоацетату (Ангіолін) увійшли до звіту, який представлений в ДУ «Державний експертний Центр МОЗ України» з метою створення нового лікарського препарату.

Новизна досліджень підтверджена патентами України (№ 106867 від 10.10.2014 та № 111462 від 25.04.2016). Результати дослідження впроваджені в педагогічний процес і наукову роботу Запорізького державного медичного університету, Дніпропетровської державної медичної академії, Буковинської державної медичної академії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»; кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету; кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету; кафедри загальної та медичної фармакології Одеського національного медичного університету, а також до наукового процесу ДП «Державний науковий центр лікарських засобів та медичної продукції» МО України.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою науковою працею автора. Робота виконана на базі Навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету (начальник - д.мед.н., професор Абрамов А. В.) та на кафедрі фармакології та медичної рецептури (завідувач - д.б.н., професор Беленічев І. Ф.). Разом з науковим керівником визначено мету і завдання дослідження, розроблено методичні підходи для виконання експериментальної частини дисертації. Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, освоєні і відтворені моделі гострої і хронічної алкогольної інтоксикації. Самостійно виконана первинна оцінка нейропротективної активності сполук L-лізину в умовах гострої алкогольної інтоксикації, а також вивчення сполуки (S) -2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) на моделі хронічної алкогольної інтоксикації. Дисертант самостійно провів біохімічні дослідження з вивчення показників оксидативного стресу і енергетичного метаболізму головного мозку в умовах хронічної алкогольної інтоксикації, а також всі гістоморфометричні

дослідження, проведена статистична обробка отриманих даних, узагальнені і проаналізовані результати досліджень, сформульовані висновки.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на: Всеросійській науково-практичній конференції молодих вчених «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013); Міжнародній конференції молодих вчених і I-V школах ім. академіка Н. М. Емануеля (Москва, 2013); Російському національному конгресі «Человек и лекарство» (Москва, 2014); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» (Запоріжжя, 2016); V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 226 сторінках друкованого тексту (основний обсяг становить 151 сторінку) та складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 2 розділів особистих досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Робота проілюстрована 7 рисунками, 37 таблицями. Список використаних джерел містить 354 найменування, з них 280 кирилицею, 74 латиницею.

Розділ 1. Огляд літератури. Сучасна стратегія нейропротекції при алкогольній хворобі

1.1. Клітинно-молекулярно-біологічні механізми алкогольної нейродеструкції

В більшості країн світу спостерігається зростання виробництва і споживання алкогольних напоїв. Зросла доступність алкогольних напоїв, і пасивне ставлення держав до проблеми алкоголізму призвело до зростання цієї хвороби не тільки серед чоловіків, а й у значній мірі, серед жінок і навіть підлітків. Останнім часом в Україні спостерігається збільшення летальності, пов'язане з вживанням алкоголю, у розрахунку на сто тисяч населення смертність зросла майже в два рази: чоловіки - з 26 до 53 осіб, жінки - з 5 до 11,6, і на сьогодні в Україні протягом року помирає понад десять тисяч людей від недоброякісних та фальсифікованих алкогольних напоїв. [129, 213].

Відповідно до новітніх даних, отриманих з доповіді Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) про глобальний статус алкоголю, з метою допомогти державам уникнути негативних наслідків надмірного вживання алкоголю, для забезпечення соціального і фізичного здоров'я нації, було представлено статистичні дані споживання алкоголю щороку на кількість населення (у літрах чистого алкоголю). Дані було взято з зареєстрованого обсягу продажу та оцінки незафіксованого споживання. Дані досліді проводили у 193 державах [167, 286, 316].

На превеликий жаль, у цій сумнозвісній статистиці наша країна знаходиться на п'ятому місці - зараз загальне споживання алкоголю людиною за рік становить 15,60 літрів (у перерахунку на етиловий спирт), офіційне вживання – 8,10 літрів, неофіційне споживання - 7,50 літрів; споживання за типами алкоголю: пиво – 2,69 літрів, вино – 0,58 літрів, міцні спиртні напої – 5,21 літрів та інші – 0,02 літрів. Також Україна посідає перше

місце у світі за рівнем алкоголізму серед підлітків (згідно даних ВООЗ 2010 року) [136, 191].

Виходячи з вищевказаних даних, проблеми алкоголізму та зменшення токсичного впливу алкоголю на людину для України є понад актуальними. Одним з рішень цієї проблеми є пошук нових методик та засобів для нейропротекції при алкоголізмі [229, 241]. Систематичне вживання алкогольних напоїв у підлітковому віці має значно небезпечніші й серйозніші наслідки, ніж залежність від алкоголю у зрілому віці. Вплив алкоголю на етапі росту і розвитку всіх систем і функцій людини призводить до жахливих безповоротних результатів [16, 78, 131].

Систематичне вживання алкоголю, навіть у малих дозах, є передумовою виникнення та прогресування захворювань всіх внутрішніх органів. Особливо чутлива до алкоголю наша нервова система. Встановлено, що під дією алкоголю в тканинах головного мозку відзначається виражена гіперемія, розширення найдрібніших капілярів, дистрофічні зміни гліозних клітин в корі, амонієвому розі, підкіркових утвореннях, руйнування клітин мозочка [210].

Як відомо, систематичне вживання етанолу призводить до розвитку токсичної енцефалопатії (токсична енцефалопатія - комплекс психічних, мозочкових, екстрапірамідних і вегето-судинних розладів). У клінічній картині переважають різні види порушення свідомості і психічних функцій - від симптомів збудження ЦНС (психомоторне збудження з ейфорією, марення, галюцинації, судоми) до пригнічення (загальмованість, оглушення, сопор) [16].

Основні прояви і тяжкість токсичної алкогольної енцефалопатії визначаються неспецифічним впливом етанолу на мембрани клітин центральної нервової системи [185, 262].

Ситуація в цей період істотно ускладнюється внаслідок наростання метаболічних і гіпоксичних розладів, пов'язаних з окисленням етанолу і дією його метаболітів (ацетальдегід, ацетат, кетонів тіла) [147, 319]. Виникають

серйозні розлади гомеостазу (порушення кислотно-лужного стану і водно-електролітного балансу, мікроциркуляції і гемокоагуляції) [41]. Алкоголь, як нейротоксична речовина, порушує нормальне функціонування нервової тканини, спричинює безповоротне пошкодження та загибель нервових клітин. Найбільш уразливими для алкоголю є нейрони, активність метаболізму яких дуже висока. Далі за зменшенням слідує олігодендроцити, астроцити, мікроглії і клітини ендотелію капілярів. Пошкодження структури клітинних мембран порушує їх електророзбудливість і перешкоджає проведенню імпульсу [219].

Алкоголь змінює стан білкового компоненту мембран, вміст рідини в них, здатність мембран до транспортування іонів, що призводить до набухання нейронів і астроцитів, пошкодження легко вразливих клітин, що вистилають капіляри. Розрив нейротрансмітерних шляхів блокує постсинаптичні рецептори, провокує помилкові нейротрансмітерні ефекти і порушує синтез, накопичення, вивільнення, поглинання або ферментну інактивацію природних нейротрансмітерів [258]. Таким чином, клінічні прояви токсичної дії алкоголю визначаються низкою різних факторів: фізичними характеристиками самої нейротоксичності речовини, її дозою, характером мішеней, що вибірково піддаються впливу структур нервової системи, здатністю організму метаболізувати і виводити токсичну речовину, здатністю пошкоджених структур і процесів до відновлення. Етиловий спирт, як і інші анестезуючі речовини, впливає на структурно-динамічний стан біологічних мембран, результатом чого є зміна рідкокристалічного стану мембран, в яких зростає рухливість молекул ліпідів і білків [223]. Етанол локалізується в центральній гідрофобній області ліпідного бі-шару, що призводить до її розбалансованості, гідрофільна область, навпаки, додатково стабілізується. Цей висновок підтверджується зниженням температури фазового переходу «гель - рідкий кристал» в присутності етилового спирту і підвищенням температури мезофазного переходу «бі-прошарок - гексагональна фаза». Тривале вживання етилового спирту призводить до

зміни фізико-хімічного складу ліпідів мембран, а саме, зменшення ступеня не насиченості жирнокислотних хвостів ліпідних молекул і зростання частки холестерину в складі мембрани. Зростання в'язкості мембран при хронічному впливі етанолу є адаптацією до розріджуючої дії спирту.

У процесі перетворення продуктів деградації алкоголю утворюються вільні радикали. Ці молекули є цито- і геномотоксичними і призводять до пошкодження різних біологічних структур. Вільні радикали - це високоактивні молекули або атоми, що мають неспарені електрони на зовнішній орбіталі, і які не задіяні в утворенні хімічного зв'язку. Атоми або невеликі молекули, які є вільними радикалами, більш нестабільні, ніж великі, так як останні можуть захоплювати електрон для утворення резонансної структури (тобто стабільної структури).

Вільні радикали можуть пошкоджувати нуклеїнові кислоти, білки і ліпіди [223]. Для біологічних систем найбільш важливі кисневі вільні радикали, зокрема супероксид-аніон (superoxide (O_2^-)), оксид азоту (nitric oxide (NO)) і гідроксильний радикал (hydroxyl radical (OH)). Оксид азоту - відносно неактивний радикал, який живе всього кілька секунд, швидко реагуючи з киснем. Але якщо він взаємодіє з супероксид-аніоном, то утворюється пероксинітрит ($ONOO^-$), який розкладається з утворенням гідроксильного радикала. Пероксинітрит, як і гідроксильний радикал, реагує безпосередньо з білками і іншими макромолекулами з утворенням альдегідів і кетонів, поперечних зшивок і продуктів перекисного окислення білків і ліпідів. В умовах гіперпродукції активних форм кисню (АФК) окислювально пошкоджуються і нуклеїнові кислоти. Окислення ліпідів призводить до порушення нормальної упаковки мембранного бі-шару, що може викликати пошкодження мембранозв'язаних білків. Так, наприклад, посилення окисної модифікації ліпідів може призводити до інактивації мембранних рецепторів, а також таких ферментів, як глюкозо-6-фосфатаза і Na/K-АТФаза, яка бере безпосередню участь у підтриманні іонного гомеостазу клітини. У мітохондріях можуть пошкоджуватися як ферменти матриксу, так і

компоненти дихального ланцюга, при цьому підсилюються явища мітохондріальної дисфункції [61, 328]. Пошкоджені мембрани втрачають енергетичний потенціал, електророзбудливу функцію, контроль за іонними потоками і медіаторними системами, виникають патологічні (запальні, нейродегенеративні, злоякісні) зміни в тканинах, що врешті-решт призводить до розвитку апоптозу і загибелі клітин. Виявлене при алкоголізмі пригнічення активності каталази викликає накопичення перекису водню [318, 333]. У ранніх дослідженнях була встановлена шкідлива дія перекису водню відносно гепатоцитів і кардіоцитів, її роль в формуванні жирового гепатозу, гепатитів, цирозу печінки, алкогольного міокардиту. За новітніми даними в наш час з'являється матеріал, що переконливо свідчить про роль перекису водню в нейродеструкції при алкоголізмі. Нейродеструктивні ефекти перекису водню в центральній нервовій системі в даний час все частіше пояснюються окисною модифікацією макромолекул мембранного бі-шару, що веде до накопичення ліпідних радикалів, пероксидів, гідропероксидів і алкоксилів і змін функціональних характеристик мембрани клітини, а також до окислення сульфгідрильних білкових груп з порушенням третинної структури білка. Не виключена ймовірність впливу перекису водню на систему вторинних посередників, а також того, що і сам агент може виступати як вторинний посередник. Виявлений вплив H_2O_2 на секрецію медіатора може бути пов'язаний з окисненням білкових сульфгідрильних груп іонних каналів і білків екзоцитозу нервового закінчення і з окисною модифікацією ліпідних комплексів плазматичної мембрани і мембрани синаптичної везикули, що веде до порушення процесів секреції нейротрансмітера. Тільки 1-4% одониткових розривів ДНК провокуються пероксинітридом і гідроксильним радикалом. Велике значення при пошкодженні мітохондріальної ДНК (мтДНК) мають близькість до електрон-транспортного ланцюга і нестача гістонів, що захищають ДНК. Оксидативне пошкодження ДНК викликає зміну основ, появу AP-сайтів та інші види пошкодження [328]. Найбільшої шкоди завдає 8-оксогуанін (8-OHG), який

накопичується в ДНК з віком. Пошкодження мтДНК є набагато ширшим і зберігається довше, ніж пошкодження ядерної ДНК. Ряд досліджень показав віко-залежний характер накопичення пошкоджень мтДНК в скелетних м'язах, серцевому м'язі, мозку і печінці. Основну роль у пошкодженні грає 8-оксогуанін. Рівень 8-ОНГ в мтДНК і смертність від алкогольної хвороби прямо пропорційні. Крім того, перекис водню і гіпохлорит (OCI-) самі по собі не є вільними радикалами, але ці киснемісткі молекули можуть полегшувати утворення вільних радикалів. Всі киснемісткі молекули об'єднані терміном «активні форми кисню». АФК діють на основи в складі нуклеїнових кислот, амінокислот бічних ланцюгів білків і подвійні зв'язки в ненасичених жирних кислотах, в результаті це біологічне з'єднання не може правильно функціонувати. Пошкодження макромолекул (і клітини в цілому) в результаті дії АФК називається оксидативний стрес.

Активні форми кисню при алкоголізмі відіграють негативну роль в ініціації нейроаптозу [333]. Активація нейроаптозу є першопричиною розвитку стійких порушень когнітивно-мнестичних функцій ЦНС. Нейроаптоз розвивається як каскадний процес, який супроводжується активацією (індукцією утворення) специфічних про- чи антиапоптичних білків, а також особливих протеолітичних ферментів – каспаз [142, 312]. Серед факторів запуску апоптозу відзначають утворення активних форм кисню в процесі «збоченого» шляху окисного метаболізму в клітині. Існують переконливі докази того, що центральна роль в продукції АФК і подальшому розвитку апоптозу і некрозу належить мітохондріям, зміні проникності їхніх мембран через формування специфічного комплексу мітохондріальних пор і ініціювання мітоптозу. Первинне джерело АФК - мітохондрії, що відіграють ключову роль в енергетичному забезпеченні клітини. АФК, а саме супероксид, утворюється в так званих «паразитарних» реакціях, у початковій ділянці дихального ланцюга мітохондрій (CoQH₂-NAD⁺) за участю NADH-CoQH₂-редуктази, активність якої підвищується при блокаді цитохром-С-залежного рецептора на зовнішній поверхні мембрани мітохондрії на фоні

підвищення відновлених флавінів. Під дією гідроксил-радикала відбувається відкриття мітохондріальних пор з експресією і виходом в цитозоль проапоптичних білків. Відкриття пор відбувається за рахунок окислення тіолових груп цистеїну, залежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій (АТФ/АДФ-антипортер), що перетворює його в проникливий неспецифічний канал-пору. Відкриття пор перетворює мітохондрії з «електростанцій» в «топку» субстратів окислення без утворення АТФ. Зараз існує узагальнене поняття «мітохондріальна дисфункція». Це типовий патологічний процес, який не має етіологічної та нозологічної специфічності. В результаті розвитку мітохондріальної дисфункції відбуваються порушення зворотного захоплення медіаторів (таких як дофамін, серотонін, катехоламіни), генерації та проведення імпульсу, процесів трансляції та транскрипції, іонного транспорту, синтезу білка *de novo*; активізуються «паразитарні» енергопродукуючі реакції, що призводить до істотного спаду енергетичних запасів нейрональної клітини [6, 61, 328]. Таким чином, причиною порушення енергоутворюючої функції мітохондрій в тканинах головного мозку при алкоголізмі є ініціація окисного і нітрозуючого стресу, окисне пошкодження функціональних молекул клітин з подальшим розвитком мітохондріальної дисфункції [61, 220, 330].

При алкоголізмі порушується і геномна відповідь, зокрема, змінюється характер експресії гена раннього реагування *c-fos*, який швидко і разом з тим тимчасово активується у відповідь на вплив самого широкого спектру стимулів. Він перебуває під контролем множинних сигналопередаючих систем. Так, при дії різноманітних чинників, що призводять до активації клітинної проліферації або диференціювання, максимум експресії гена *c-fos* спостерігається зазвичай через 30-45 хв після впливу. Промотор гена *c-fos* має складну організацію, обумовлюючи необхідні функціональні властивості цього гена, пов'язані з клітинним диференціюванням і проліферацією, а також з цілим рядом стресових реакцій. При взаємодії зовнішніх факторів з клітинною поверхнею специфічно активуються внутрішньоклітинні процеси,

що викликають взаємодію певних транскрипційних факторів з промотором гена *c-fos*. Залежно від характеру впливу може активуватися великий набір шляхів передачі сигналу, центральну роль в яких грають як мембранні компоненти (рецептори, G-білки і Ras-білки, адаптерні білки, тирозин специфічні протеїнкінази), так і цитоплазматичні протеїнкінази (PKC, PKC, компоненти MAP-кіназного каскаду).

В механізмі розвитку стану залежності або пристрасті до алкоголю ключова роль належить саме гену *c-fos*, який, змінюючи характер експресії, викликає (за рахунок порушення синтезу регуляторних білків) зміну поведінки. Стан алкогольної залежності людини характеризується тісним переплетінням нейрохімічних, генетичних, психологічних, соціальних та культурних факторів. У структурі великого наркотичного синдрому психічна (психологічна) залежність від психоактивних речовин (ПАР) відрізняється найбільшою тривалістю. Вона може бути супутньою явищам фізичної залежності, що розвиваються після припинення дії ПАР, зберігатися тривалий час після ослаблення та зникнення синдрому фізичної залежності. І.М. П'ятницька визначає синдром психічної залежності як сукупність психічного потягу до ПАР і здібності досягнення стану психічного комфорту в інтоксикації. В інтерпретації психолога під синдромом психічної залежності розуміють «психічне новоутворення, що виявляється в непереборному прагненні людини постійно приймати наркотичний або інший препарат з тим, щоб знову випробувати бажані відчуття або усунути явища психологічного дискомфорту. У рамки даних тлумачень синдрому укладаються і інші його визначення. Синдром психічної залежності як складова частина адиктивної хвороби формується за участю ряду психічних процесів: мотивацій, емоцій, пам'яті.

Об'єднання зазначених понять необхідно для більш чіткого уявлення про природу синдрому психічної залежності, про механізми адиктивної поведінки (в клініко-діагностичному аспекті адиктивна поведінка, мабуть, може розглядатися в якості початкової ланки залежної поведінки). Якщо

оцінювати дані категорії відповідно до Міжнародної класифікації хвороб (МКБ-10), то адиктивна поведінка відноситься до F10.1-F19.1 («неодноразове вживання ПАР зі шкідливими наслідками»), а залежна поведінка - до F10.2-F19.2 («синдром залежності від ПАР»). Такі спроби робилися в рамках теорії функціональних систем, теорії доміанти, авторської концепції «флуктуючого емоційного градієнта», теорії про спільність нейроанатомічних і нейрохімічних субстратів різних типів хімічної залежності.

Ясно, що подібні питання можуть знаходитися в компетенції різних наук: фізіології, анатомії, психології, нейрохімії та ін. [59, 230]. Це простежується в структуризації патогенезу синдрому психічної залежності, розглянутого з різних позицій:

- структурно-анатомічних, під якими розуміють сукупність залучених до формування синдрому структур головного мозку;

- нейрофізіологічних, що включають взаємодію структур головного мозку, формування нових міжнейронних зв'язків у процесі становлення синдрому психічної залежності, пам'ять про ефекти психоактивної речовини, багаторівневі взаємодії структур в період адиктивної поведінки, нейрональні основи психічних процесів, що забезпечують підтримання синдрому і т.д.;

- нейрохімічних, мається на увазі комплекс нейромедіаторних систем, залучених до виникнення і підтримки синдрому психічної залежності, динамічні порушення різних видів синапатичної передачі в процесі наркотизації (алкоголізації) і після неї, зміни механізмів передачі позаклітинного сигналу всередині нейрона, у тому числі і реакції відповіді гена *c-fos* на вплив ПАР.

Таким чином, враховуючи важливу роль гена *c-fos* як в ініціації нейроапоптозу, так і в розвитку психічної залежності при алкоголізмі, необхідний пошук лікарських препаратів, які б могли в деякій мірі впливати на експресію даного гена, нормалізуючи його активність. У цьому аспекті вартим нашої уваги є застосування препаратів, які є лігандами

нейропептидних рецепторів і здатні регулювати апоптоз, синтез ферментів, експресію транскрипційних факторів, регенеруючи мітохондріальну ДНК, і ферментів, які каталізують енергетичні реакції [45, 194, 297]. Ці обставини визначають особливу актуальність подальшого дослідження біохімічних, молекулярних аспектів патогенезу алкоголізму, а також активний пошук нових високоефективних церебропротекторних лікарських препаратів для комплексного лікування алкоголізму [18, 90, 92, 105, 267].

1.2. Нейропротектори в комплексній терапії алкогольного ураження головного мозку: класифікація, фармакологічна характеристика та перспективи подальших розробок

Застосування нейропротекторів з метою захисту структурно-функціональної цілісності нейронів від несприятливих зовнішніх і внутрішніх впливів почалося в 70-х роках минулого століття. І з тих пір сфера застосування фармакологічних засобів цієї групи неухильно розширюється. Призначення нейропротекторів є одним з найбільш ефективних методів лікування хворих з недостатністю мозкового кровообігу, і він дозволяє запобігати розвитку важких і незворотних ушкоджень нейронів [72, 40, 135]. Як за кордоном, так і в Україні протягом десятиліть продовжується активний пошук, розробка, вдосконалення та створення більш активних нейропротекторних препаратів [324]. Всі сучасні нейропротектори умовно поділяються на первинні, дія яких спрямована на переривання швидких реакцій глутамат-кальцієвого каскаду (ця група використовується з перших хвилин ішемії і триває протягом першої доби ураження головного мозку), та на засоби вторинної нейропротекції, які застосовуються з метою переривання відстрочених механізмів загибелі нейронів - надлишкового синтезу АФК, оксидативного стресу, дисбалансу цитокінів, імунних порушень, трофічної дисфункції, апоптозу [50, 86, 177, 201, 276]. Серед засобів первинної церебропротекції найбільш широке застосування знайшли

антагоністи потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу - похідні дигідропіридину [351]. Найбільш вивчений препарат цієї групи – це німодипін, в основі фармакологічної дії якого лежить запобігання судинного спазму після субарахноїдального крововиливу, посилення фібринолізу, гальмування вільнорадикального окислення [92, 114, 259, 277].

Німотоп знижує явища неврологічного та когнітивного дефіциту і підвищує виживаність пацієнтів з мозковими інсультами та черепно-мозковою травмою [189, 281, 338]. Іншими препаратами групи первинних нейропротекторів - похідних дигідропіридину, є дародипін, ісрадипін, цереброкрас [165, 323]. Причому за нейропротективною дією цереброкрас перевершує німодипін [282, 283, 307]. Проводяться роботи по застосуванню як первинних нейропротекторів антагоністів NMDA-рецепторів дізолціпіну, дексрорфану, церестату. Експериментально показано їх ефективність при субтотальній і фокальній ішемії головного мозку, нейродеструкції, обумовленій центральними отрутами збудливої дії [235, 342]. Однак клінічні випробування цих препаратів були припинені через грубі побічні ефекти (ністагм, артеріальна гіпотонія, катаплексія, локомоторні порушення, галюцинації і т.д.) [152, 239]. Зацікавленість фармакологів і клініцистів до себе привертають препарати магнію як засоби первинної нейропротекції. Іони магнію мають здатність пригнічувати гіперзбудливість NMDA-рецепторів головного мозку, тим самим знижуючи ексайтотоксичність. В ЗДМУ розроблена лікарська комбінація на основі хлориду магнію і нейроамінокислот для парентерального застосування [145, 180].

Найбільш перспективними є антагоністи гліцинового ко-сайту NMDA-рецепторів, які за силою нейропротективної дії не поступалися фармакологічним стандартам і були більш безпечними, ніж інші антагоністи NMDA-рецепторів. В даний час 2 препарати цієї групи (GV-150526Δ і ACEA-1021) проходять другу стадію клінічних випробувань. Гліцин володіє метаболітотропною дією, проявляє протисудомну активність, пов'язує низькомолекулярні токсичні продукти, що утворюються в процесі ішемії.

Будучи природним метаболітом мозку, він не виявляє токсичності навіть у високих дозах (більше 10 г/добу) [304]. Найбільш суттєвим побічним ефектом препарату може вважатися легкий седативний ефект. Нейропротективний ефект гліцину підтверджується дослідженнями під керівництвом проф. Бєленічева І. Ф., якими показано, що при моделюванні експериментальної церебральної ішемії гліцин підвищував виживаність тварин, поліпшував енергетичний метаболізм і зменшував прояви оксидативного стресу [149, 186, 326]. Інкубування нейрональної суспензії з агоністами глутаматних рецепторів - глутамат, каїнат і N-метил-D-аспартат в ексайтотоксичних концентраціях призводить до загибелі клітин за типом як апоптозу, так і некрозу [55, 137, 308]. Внесення гліцину в інкубаційні проби при моделюванні глутаматної ексайтотоксичності *in vitro* попереджає клітинну загибель, зменшує явища некрозу і, особливо, апоптозу нейронів. Інгібуючу дію на процеси клітинної загибелі гліцин надає при порушенні NMDA-рецепторів. Гліцин виводить пацієнтів з глибоких запійних станів, і сприяє зняттю сильного сп'яніння. Препарат, проникаючи в організм, прискорює метаболізм і виведення етанолу з організму.

До засобів вторинної нейропротекції відносять препарати, які гальмують відстрочені механізми загибелі клітин - антиоксиданти, нейропептиди, блокатори прозапальних цитокінів, ноотропи [37, 173, 340]. Останнім часом активно ведеться пошук високоефективних нейропротекторів серед нейропептидів [40, 117, 322, 349]. Новим напрямком у дослідженні нейропептидів стало визначення їх ролі у регуляції апоптозу, а також їх впливу на експресію генів раннього реагування. Поряд з даними, які свідчать про участь вазоактивного пептиду ендотеліну-1 та його рецепторів (ETA) в ішемічній патології мозку, отримано інформацію про антиапоптичну активність цього пептиду [130, 336, 346, 354]. На ряді моделей нейроапоптозу було також продемонстровано захисну дію кальцітонінового нейропептиду (CGRP) й пептидного фрагменту ангіотензину IV. Водночас було встановлено, що ангіотензин II, як і пептид кальцій-нейрин, навпаки,

сприяє індукції проапоптичного каскаду. Ці факти, які демонструють значущість нейропептидів і ростових факторів у нормальній і патологічній діяльності мозку, відображають організацію поліваріантності системи хімічної регуляції, що забезпечує як захист нейронів від несприятливого впливу і їх життєздатність, так і програмовану загибель певної частини клітинної популяції у випадку пошкодження мозку. В даний час в якості засобів вторинної нейропротекції при алкогольній інтоксикації використовуються нейротрофічні препарати - цереброкурин, кортексин та церебrolізін [41, 45, 84, 170, 285, 343].

Цереброкурин, кортексин і церебrolізін при введенні тваринам з хронічною алкогольною інтоксикацією покращували показники орієнтовно-дослідницької діяльності, збільшували латентний період УРПУ; зменшували прояви неврологічної симптоматики (за шкалою McGrow); збільшували щільність нейронів СА-1 зони гіпокампу, зменшували щільність апоптичних змінених нейронів, підвищували експресію білка bcl-2 [60, 156, 232]. Призначення цереброкуруну протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації за силою нейропротективної дії перевершувало ефективність кортексину і церебrolізіну [76, 105, 171, 306]. Також встановлено, що цереброкурин гальмує пероксидацію мембранних фосфоліпідів, гальмує активність ліпоксигенази в каскаді арахідонової кислоти, блокує продукцію $O_2 \cdot OCl^-$ активованими лейкоцитами, пригнічує індукційну NO-синтазу і захищає від дії ONOO⁻. Цереброкурин гальмує експресію прозапальних цитокінів, зменшує ступінь цитотоксичного набряку. Встановлено, що препарат опосередковано, через зниження рівня АФК, гальмує вироблення факторів транскрипції і надалі знижує експресію генів, відповідальних за синтез індукційної NO-синтази [249]. Механізм нейропротективної дії цереброкуруну при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації реалізується за рахунок нормалізації енергообміну нейронів, гальмування нітрозативного стресу і зниження в тканинах мозку нейротоксичного

деривативу NO-нітротирозину, пригнічення нейроаптозу і посилення експресії bcl-2 [41, 181, 222].

Однією з цікавих і клінічно затребуваних груп вторинної церебропротекції є ноотропи [100, 225]:

1. Пірролідонові ноотропи (рацетами), метаболічної / рецепторної дії: пірацетам, оксірацетам, анірацетам, праміцетам, етірацетам, діпрацетам, ролзірацетам, небрацетам, ізацетам, нефірацетам, детірацетам, фенотропіл [37, 70, 331].

2. Холінергічні речовини: посилення синтезу ацетилхоліну і його викиду (холінхлорид, фосфатидилсерін, лецитин, ацетил-L-карнітин, цитиколін, похідні амінопіридину, і ін.) [128, 134, 212, 224, 252, 270, 299, 303, 310, 344].

3. Агоністи холінергічних рецепторів (оксотреморін, бетанехол, спіропіперидіни, хінуклеотиди) [318].

4. Агоністи дофамінових рецепторів (проноран) [7, 240].

5. Інгібітори ацетилхолінестерази (донепезил, фізостигмін, такрин, аміридін, ертастігмін, галантамін, метріфонат, велнакрін малеат і ін.) [182, 341].

6. Речовини, що впливають на систему ГАМК: гаммалон, пантогам, пікамілон, дігам, нікотинамід, фенібут, натрію оксибутират, нейробутал та ін. [51, 89, 202, 218].

7. Модулятори глутаматергічної системи: низькоафінні антагоністи поліамінового сайту NMDA-рецептору і часткові агоністи AMPA рецептору (мемантин, мілацемід), агоністи AMPA-рецепторів (нооглютіл, риталін, модафініл), коагоніст NMDA-рецептору – гліцин [121, 269, 334, 350].

8. Засоби, що впливають на серотонінергічну систему: антагоніст 5-НТ6 рецепторів SB742457, частковий агоніст 5-НТ4 рецепторів SL650155, агоністи 5НТ1а рецепторів – халіпроден, 8-ОН-DPAT й ін., антагоністи 5-НТ3 рецепторів – ондасетрон, мірісетрон.

9. Нейростероїди і мелатонін: 7- β -естрадіол, естрадерм, J811, J861, дегідроепіандростерон (DHEA), карбенексолон, мелатонін.

10. Комбіновані препарати: пірацетам + цинаризин (фезам, нейронорм), пірацетам + тіотриазолін (тіоцетам), пірацетам + аміналон, пірацетам + вінпоцетин (вінпотропіл), пірацетам + оротова кислота (ороцетам), пірацетам + діазепам (діапірам), пірацетам + янтарна кислота + рибоксиин + нікотинамід +рибофлавін-мононуклеотид, піридоксин (нейронал), гексабідин + етаміван + етафілін (інстенон), янтарна кислота + рибоксин + нікотинамід + рибофлавін-мононуклеотид (цитофлавін) [66, 85, 119, 153, 168, 256, 278, 339].

Найбільш широке, і історично тривале, застосування в наркологічній, психіатричній практиці знайшли «справжні» ноотропи - рацетами. На сьогодні синтезовано вже більше 10 ноотропних препаратів пірролідинового ряду, які перебувають у стані третіх клінічних випробувань чи навіть мають реєстрацію в ряді держав. Мова йде про такі препарати, як анірацетам, дупрацетам, цебрацетам, нефірацетам, етірацетам, прамірацетам, оксірацетам, ізацетам й інші [234, 345].

Комплексна дія рацетамів покращує біоелектричну активність й інтегративну діяльність мозку, що виражено в характерній зміні електрофізіологічних патернів (наприклад: зростання періоду неспання, забезпечення покращеного проходження інформації між півкулями, збільшення піку, який домінує, посилення абсолютної й відносної потужності спектра ЕЕГ кори і гіпокампу тощо). Встановлено, що пірацетам, оксірацетам і анірацетам активують АМРА-тип глутаматних рецепторів (ендогенним лігандом є аміно-3-гідрокси-5-метилізоксазол-4-пропіонат), але при цьому не впливають на NMDA-рецептори нейронів [138, 214, 347]. Це приводить до зростання виходу кальцію з клітини, в результаті чого знижується концентрація цього внутрішньоклітинного посередника. В інших дослідженнях специфічна ноотропна дія пірацетаму характеризувалася збільшенням щільності NMDA-рецепторів [279, 339]. Також визначено, що анірацетам полегшує тривалу потенціацію та підсилює синаптичну передачу.

Еталонним препаратом в групі нейрометаболических стимуляторів є ноотропіл, а також вітчизняний пірацетам, які входять до складу згаданих вище комбінованих препаратів. Ноотропіл використовують в комплексі засобів, блокуючих алкогольну абстиненцію (знижує вираженість церебральних судинних розладів, зменшує запаморочення, сприяє усуненню головного болю), і в постабстинентному періоді (зменшує апатію, сонливість, виснаженість) [75].

Додавання ноотропілу в комплекс засобів купірування алкогольного абстинентного синдрому дозволяє провести лікування хворих в амбулаторних умовах.

При перед-деліріозних станах, що розвилися в алкогольних деліріях і станах наркотичної абстиненції ноотропіл вводять внутрішньом'язово або внутрішньовенно [148]. Це помітно прискорює деліріозні стани, зменшує кількість ускладнень, астенічних проявів у постделіріозному періоді [190]. І лише після поліпшення стану хворих переводять на прийом ноотропілу перорально. Ноотропіл може застосовуватися в токсикологічній практиці для більш швидкого відновлення церебральних функцій, зокрема при різних отруєннях, в тому числі солями літію (карбонат літію, оксибутират літію). В наркологічній практиці ноотропіл показаний при більшості клінічних синдромів зловживання психоактивними речовинами; введення ноотропілу в терапевтичні схеми підвищує ефективність детоксикаційних програм при алкоголізмі та наркоманії. Крім того, препарат має помірну здатність зменшувати патологічний потяг до алкоголю, найчастіше в тих випадках, коли в клінічному синдромі переважають астенічні прояви.

При лікуванні алкогольного абстинентного синдрому з вегетосоматичними і неврологічними розладами (Н.Н. Іванець, М. А. Віннікова, 2002) показано введення ін'єкційного ноотропілу (препарату вибору) до 40,0 мл — 20% інфузійно, ноотропілу 800-1600 мг/добу, інстенону внутрішньовенно струменево, перорально. Застосування в наркологічній і неврологічній практиці знаходить фенільну похідну

рацетамового ряду фенотропіл (м-карбамоїл-метил-4-феніл-2-піролідон) [187, 204]. Фенотропіл є новим оригінальним високоефективним ноотропним препаратом і володіє широким спектром супутніх компонентів фармакологічної активності [70, 118, 154]. В експерименті вивчені психо- і нейротропні ефекти і підтверджено безпечність препарату. Виявлено, що фенотропіл має виражену антиамнестичну активність в дозах 6-750 мг/кг, надає прямий активуючий вплив на інтеграційні функції мозку, покращує обмінні процеси і регіонарний кровотік в ішемізованих ділянках мозку, відновлює мову і рухову активність при їх порушенні, а в дозах 100-750 мг/кг має виражену протигіпоксичну, протисудомну і анксиолітичну активність [120, 121]. В експерименті встановлено, що фенотропіл в умовах алкогольно-токсичного ураження головного мозку зменшує вираженість когнітивно-амнестичних та емоційних порушень, а також перешкоджає розвитку дегенеративних гістоморфологічних змін тканини головного мозку. Також відомо, що фенотропіл володіє нейропротективною дією при субхронічній алкогольній інтоксикації, полегшує симптоми абстинентного синдрому: дефіцит локомоторної і дослідницької поведінки, когнітивна дисфункція і тривога. Увагу привертає новий представник групи рацетамів – прамірацетам [108, 110]. Зокрема встановлено, що прамірацетам сприяє зростанню холінергічної передачі в гіпокампі шляхом підсилення високоактивного зворотного захоплення холіну, завдяки вибірковій селективності до Na-залежної синаптосомальної системи і, крім цього, пригнічує пролінендопептидази мозку. Характерно, що ці ефекти прамірацетаму спостерігалися тільки в холінергічних нейронах гіпокампу (зона CA1), але не в корі чи стріатумі. Також цей препарат збільшував швидкість натрійзалежного поглинання холіну в гіпокампі [54, 331]. Прамірацетам, можливо за рахунок властивих холінергічних ефектів, сприяє стимуляції синтезу оксиду азоту (NO) – який приймає участь в процесах формування пам'яті і особливо нетривалої пам'яті [111, 300]. Це підтверджено підсиленням експресії мРНК та активності синтази оксиду азоту в корі

головного мозку щурів. Також під впливом цього засобу активується і синтез основного «нейропептиду пам'яті» в ЦНС – вазопресину, який приймає активну участь в забезпеченні когнітивних функцій та процесів пам'яті. Прамірацетам розглядається як ефективний ноотроп для корекції когнітивно-мнестичних порушень, депресій у пацієнтів, що страждають на хронічний алкоголізм [302].

Особливий інтерес представляють препарати з групи ГАМКергічних засобів. Є переконливі експериментальні дані, що доводять ефективність цих засобів в лікуванні хронічного алкоголізму. У клініці ці препарати довели свою ефективність, значно покращуючи процеси енергетичного метаболізму мозку і знижуючи явища когнітивного дефіциту. У механізмі нейропротективної дії більшості ГАМКергічних засобів присутня їх виражена метаболітотропна дія, позитивний вплив на біоенергетику нейрону, зниження продуктів оксидативного стресу, обмеження глутаматної ексайтотоксичності за допомогою позитивного впливу на ГАМКергічну систему. Серед ГАМК-ергічних ноотропів мають позитивну клінічну історію такі препарати - гамма-аміномасляна кислота, ноофен, пікамилон і пантогам [55, 73, 162, 257].

Гамма-аміномасляна кислота застосовується в клініці алкоголізму для лікування постабстинентних і постделіріозних станів, астенії, астенодепресивних, апатичних і депресивних станів, а також при алкогольній енцефалопатії, алкогольних поліневритах, слабоумстві [146, 251].

Ноофен (фенібут, нообут) значно зменшує напруженість, відчуття тривоги, страху, надаючи виражений седативний ефект, тому особливо показаний хворим в період алкогольного абстинентного синдрому, що протікає з тривожним компонентом [352]. В даний час визначено, що найбільш ефективним є використання ноофену в разовій дозі 500 мг [122, 268, 274].

Пікамилон (picamilonum) призначають хворим на хронічний алкоголізм (поза гострого періоду абстиненції для корекції граничних

психопатологічних розладів). У клініці алкоголізму препарат призначають у період абстинентного синдрому для усунення загальної слабкості, млявості, почуття тривоги. Помічена ефективність курсового застосування пікамілону у хворих на алкоголізм, які перенесли черепно-мозкову травму, і з проявами енцефалопатії [89, 271].

Когітум (cogitum) випускається в ампулах по 10 мл і містить як діючу речовину 250 мг ацетиламіносукцинату двокалієвої солі. У наркології препарат може знайти застосування при лікуванні астеничних станів (втоми, знесилення) з депресією легкого ступеня, на відновному та підтримуючому етапах лікування алкоголізму, наркоманії та неалкогольної токсикоманії, в тому числі і як допоміжний засіб при призначенні антидепресантів. Хороша переносимість когітума дає можливість використовувати його у лікуванні дітей і осіб похилого віку [123].

Останнім часом обговорюється питання про застосування в наркології ноотропів – міметиків глутамінових АМРА-рецепторів (ампакінів) – модафінілу і риталіну. Препарати, призначені для поліпшення пам'яті, впливають головним чином на два процеси, що розвиваються в нейронах під час консолідації пам'яті: деполяризацію мембрани і активацію CREB-білка [179,124]. Центральний дофаміноміметик донепезил (aricsept) в даний час дозволений в США як засіб для припинення прогресуючої втрати пам'яті при хворобі Альцгеймера, а також при нарколепсії [126]. Хорошу нейропротективну дію мають антиоксиданти – похідні оксіпіридину: емоксипін і його бурштинокисла сіль – мексидол [3, 62, 280, 340]. Емоксипін і мексидол є високоефективними інгібіторами СРО, вони гальмують окисну модифікацію білка, підвищують активність СОД, каталази, глутатіонпероксидази та глутатіону відновленого в ішемізованому мозкові [250]. Обидва препарати мають виражену мембраностабілізуючу дію. Мексидол захищає білкові компоненти мембран нейронів - рецептори, іонні канали, покращує нервову провідність і синаптичну передачу, стимулює енергостимулюючі функції мітохондрій і синтез АТФ [151, 164]. Обидва

препарати показали терапевтичну ефективність в умовах лікування каротидного інсульту [266]. Препарати, особливо мексидол, сприятливо вплинули на регрес неврологічного та когнітивного дефіциту і нормалізували патерн ЕЕГ, при цьому не мали значущих побічних ефектів [91]. За рахунок активації окислювальних процесів в так званому циклі Кребса (центральна ланка обмінних процесів в організмі) мексидол посприяє якнайшвидшому окисленню недоокислених продуктів розщеплення алкоголю [193]. Мексидол усуває неврологічні і нейротоксичні прояви гострої алкогольної інтоксикації, викликані одноразовим введенням високих доз етанолу, а також відновлює порушення поведінки, вегетативного і емоційного статусу, усуває погіршення когнітивних функцій, процесів навчання і пам'яті, викликаних тривалим (5 місяців) введенням етанолу і його відміною, перешкоджає накопиченню ліпофусцину в мозковій тканині [63, 79, 155, 213].

В даний час в складі комбінованої терапії невідкладних станів, обумовлених прийомом етанолу, з метою лікування алкогольних уражень печінки, серця і головного мозку у хворих з соматичною патологією використовують структурний аналог гамма-бутиробетаїну – Мілдронат. Він в умовах ішемії знижує швидкість транспорту жирних кислот в мітохондріях і збільшує їх кількість в цитоплазмі, що призводить до активації окислення глюкози. Одночасно попереджається накопичення активізованих форм недоокислених жирних кислот і поліпшується транспорт АТФ з мітохондрій [179]. Мілдронат активує два найбільш важливих ферменти в циклі аеробного окислення глюкози: гексокіназу і піруватдегідрогеназу, що запобігають ацидозу за рахунок зменшення утворення лактату. Мілдронат знижує концентрацію карнітину, а рівень гамма-бутеробетаїна при цьому зростає в десятки разів. В результаті, через стеричної подібності молекул гамма-бутеробетаїну і ацетилхоліну, відбувається активація ацетилхолінових рецепторів, що може привести до ініціювання синтезу NO [179, 229]. Даний препарат проявляє антиоксидантну дію, знижуючи продукцію АФК мітохондріями і гальмує ініціацію апоптозу [226, 229]. Ефективність

застосування Мілдронату по відношенню перекисного окислення ліпідів, ліпідного складу крові, маркерів запалення міокарда в даний час досить широко підтверджена низкою клінічних досліджень. Призначення препарату, як в експерименті, так і в комплексній терапії алкогольної залежності на етапі становлення ремісії дозволяє підвищити якість життя осіб, з алкогольною залежністю і сприяє регресу симптоматики неврологічного дефіциту, відновлення функціональної незалежності, поліпшенню мозкового кровообігу [64, 210, 219, 226].

1.3. Похідні L-лізину - перспективні засоби нейропротекції при алкогольному ураженні головного мозку

Також нашу увагу, як перспективний нейропротектор, привернула незамінна амінокислота L-лізин [40, 150]. Є ряд досліджень, присвячених дослідженню нейротропних, імунотропних, знеболюючих властивостей цієї амінокислоти. Лізин у великій кількості міститься в нейронах кори, особливо пірамідних. Дефіцит лізину призводить до нейроапоптозу і розвитку когнітивного дефіциту. Все це дає можливість припустити можливу роль лізину як трасміттерної молекули. Отримано дані про участь лізину в регуляції деяких нейротрансмітерних систем – ГАМК-ергічної, серотонінергічної.

Лізин проявляє властивості анксиолітика, ендогенного антиконвульсанта. Ефекти лізину здійснюються через посилення афінності ГАМК бензодіазепін-рецепторного комплексу. При цьому роль нейротрансмітера або нейромодулятора в центральних гальмівних системах ГАМК відводиться головному метаболіту L-лізину в тканині мозку – піпеколовій кислоті. За допомогою радіолігандного зв'язування показано також, що L-лізин може бути частковим антагоністом рецепторів серотоніну [353]. В результаті системного аналізу встановлено вплив L-лізину на інтегративну діяльність мозку, яка проявляється у формуванні біологічної

відмінності у поведінці, а також його дію на імунологічну реактивність та вроджені механізми захисту. Зацікавленість представляють різні похідні лізину. Так, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид (NIL) широко застосовується в дослідницьких цілях як селективний інгібітор індукцибельної NOS. Відомі нейропротективні властивості NIL на моделях ішемії мозку і ЧМТ. Тварини з мозковими інсультами, які отримували NIL, проявляли менш виражені неврологічні розлади. Введення NIL значно зменшує щільність нейронів з ознаками дегенерації, знижує загибель нейронів. NIL знижує маркери оксидативного стресу і гальмує нейрозапалення, пригнічуючи експресію IL-1 β . Внесення NIL в культуру нейронів в концентрації 10 мкМ знижує нейроапоптоз, викликаний бета-амілоїдом. В останні роки широке застосування в неврологічній і нейрохірургічній практиці отримав L-лізину есцинат [93]. Цей препарат, володіючи унікальними властивостями різного ступеня, здатний переривати каскад реакцій, що запускаються в головному мозку у відповідь на ішемічне ураження, і зменшувати пошкодження ендотелію [284]. L-лізину есцинат володіє потужними протизапальними, антиексудативними і мембранотропними властивостями [159]. В результаті дії L-лізину есцинату підвищується резистентність судин за рахунок зменшення кількості пір капілярів і збільшення проникності мембран ендотеліоцитів, що призводить до збільшення току тканинної рідини в просвіт капіляра і зменшення периваскулярного набряку [188, 273, 332]. Також спостерігається зниження активації ендотеліоцитів, що попереджає адгезію нейтрофілів на внутрішній поверхні судинної стінки та захищає її від ушкодження. На кафедрі фармакології ЗДМУ були проведені дослідження з вивчення нейропротективних властивостей лізину гідрохлориду та L-лізину есцинату на моделі церебральної ішемії [228]. Встановлено, що лізин і його сіль з сапонінами каштана достовірно знижують летальність, зменшують прояви неврологічного дефіциту, гальмують реакції оксидативного стресу і знижують загибель нейронів сенсомоторної кори у тварин з ішемією мозку

[127, 172]. Все це дозволяє розглядати молекулу L-лізину як основу для створення нових біологічно активних молекул. Як можливі структурні фрагменти, що можуть бути приєднані до молекули лізину, були обрані похідні 1,2,4-триазолу [206, 288, 335].

На кафедрах фармацевтичної хімії і фармакології Запорізького державного медичного університету в результаті скринінгових досліджень похідних 5-тіо-1,2,4-триазолу виявлені сполуки, які проявляють високу противірусну, протимікробну, протигрибкову, нейролептичну, антигіпертензивну, діуретичну, протизапальну, аналептичну і анальгезуючу дії [237, 238]. Співробітниками кафедр фармакології ЗДМУ, НФАУ, ДДМА, ЛугДМУ серед похідних 5-тіо-1,2,4-триазолу виявлені сполуки з високою анаболічною, ранозагоювальною, антигіпоксичною активністю [174, 335]. У працях Дунаєва В.В., Тішкіна В.С., Беленічева І.Ф., Башкіна І.Н., Стеця В.Р. описані похідні 5-тіо-1,2,4-триазолу, які продемонстрували антиоксидантну, мембраностабілізуючу, органопротективну дію на моделях токсичного ушкодження, інфаркту міокарда, ішемії головного мозку, гіпобаричної гіпоксії [38, 176]. Похідні 5-тіо-1,2,4-триазолу інгібують процеси оксидативного стресу, що проявляється в зниженні маркерних продуктів - МДА, АФГ, КФГ, нітротирозину; зменшують гіперферментемію специфічних ізоензимів - МВ-КФК, ВВ-КФК, ЛДГ [54]. Яскравим представником сімейства 1,2,4-триазолу є тіотриазолін, який був розроблений в НВО «Фарматрон» під керівництвом професора І.А.Мазура. Тіотриазолін зайняв гідне місце в арсеналі метаболітотропних засобів [160]. Він відноситься до метаболітних засобів з вираженим антиоксидантним механізмом дії. Як представник групи метаболітних препаратів тіотриазолін володіє широким спектром фармакологічної активності, що особливо важливо для клінічної фармакології [119, 311]. Тіотриазолін має антиоксидантну, мембраностабілізуючу, протиішемічну, антиаритмічну, імуномодулюючу, протизапальну, гепатопротективну, кардіопротективну, нейропротективну та нефропротективну дії [68, 158, 161]. В результаті

вивчення механізму дії тіотриазоліну в період 1983-1995 рр. на кафедрі фармакології Запорізького державного медичного університету було встановлено, що в основі ефективності препарату лежить його здатність знижувати ступінь пригнічення окисних процесів у циклі Кребса, підсилювати компенсаторну активацію анаеробного гліколізу, збільшувати внутрішньоклітинний фонд АТФ (за рахунок збереження окислювальної продукції енергії на трикарбоновій ділянці і впливу на активацію дикарбонової ділянки), стабілізувати метаболізм клітини [49]. В умовах експериментального моделювання *in vivo* й *in vitro* було встановлено ряд важливих властивостей тіотриазоліну: його низька токсичність, висока цитопротективна активність незалежно від типу клітин (кардіоміоцити, гепатоцити, нейроцити та ін.), модулююча дія в умовах норми і розвитку патології, що є відображенням універсалізму механізму дії препарату. Інтенсифікація тіотриазоліном окисного вуглеводного метаболізму призводить до підвищення вмісту рівня АТФ на фоні збільшення фонду АДФ і, що принципово важливо - зниження рівня АМФ [264]. Основну роль в енергозабезпеченні клітин відіграють мітохондрії, в яких тіотриазолін активує процес НАД + Н-реокислення етанолу. Найімовірніше, захисна дія тіотриазоліну в умовах ішемії реалізується за допомогою активації малат-аспартатного човникового механізму, що забезпечує протонами електронно-транспортний ланцюг. Компенсаторне нарощування потужності малатного шунта супроводжується гальмуванням утворення з вуглеводів ацетил-КоА (піруватдегідрогеназна реакція), який при ішемії використовується для синтезу вільних жирних кислот. Активація малат-аспартатного механізму під дією тіотриазоліну сприяє не тільки продукції АТФ, але і гальмуванню патологічного синтезу ліпідів [119, 330]. Тіотриазолін зменшує утворення АФК в мітохондріях за рахунок утилізації відновлених форм піридиннуклеотидів і збереження окислювальної продукції енергії, а також в ксантинооксидазній реакції, як за рахунок нормалізації обміну аденілових нуклеотидів, так і за рахунок гальмування перетворення

ксантиндегідрогенази в ксантинооксидазу під дією окисного впливу АФК [57, 183, 215]. Тіотриазолін обмежує вироблення АФК в мітохондріях за рахунок прямої інгібіруючої дії на НАДН-оксидазні системи мітохондрій, що підтверджується нашими дослідженнями *in vitro* [68, 254]. Останнім часом з'явилися роботи про нейро-, кардіо- та гепатопротективну дію тіотриазоліну при алкогольній хворобі. Важливим моментом у дії тіотриазоліну, який відрізняє його від інших відомих метаболітотропних засобів, є його нейропротективна дія в умовах алкогольної хвороби, що було доведено в експерименті при моделюванні цього патологічного стану шляхом введення 25% етанолу в дозі 6 г/кг протягом 30 діб щурам лінії Вістар [49]. Нейропротективна дія тіотриазоліну в умовах алкогольної хвороби проявлялася в поліпшенні процесів пам'яті, поведінкових реакціях у щурів, які тривалий час отримували алкоголь, також в нормалізації енергетичного метаболізму мозку та обмеженні шкідливої дії оксидативного стресу [255]. Так, введення щурам тіотриазоліну призводило до нормалізації досліджуваних показників енергетичного метаболізму головного мозку - підвищення рівня малату, рівня глікогену, глюкозо-6-фосфату, активності цитохром-С-оксидази на фоні інтенсифікації процесів аеробної продукції АТФ. Тіотриазолін призводить і до зменшення проявів оксидативного стресу в головному мозку - зниженню маркерів – АФГ та КФГ і підвищенню активності СОД [54, 211].

З огляду на багатий досвід в розробці та створенні оригінальних нейро- і кардіопротективних засобів, в НВО «Фарматрон» під керівництвом професора І.А.Мазура було синтезовано нову сполуку, а саме, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл- 5-тіоацетат (робоча назва «Лізиній», нова назва - «Ангіолін»), що поєднує в своїй структурі фрагменти молекул тіотриазоліну і L-лізину і проявляє високі протиішемні, ендотеліопротективні, кардіопротективні, нейропротективні, антиоксидантні та протизапальні властивості [38, 44, 101, 200, 235, 337]. Під час численних експериментальних досліджень було встановлено, що за результатами

дослідження гострої токсичності Ангіолін при парентеральному введенні (миші, щури, кролі) відноситься до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) [207]. Ангіолін при парентеральному введенні не має кумулятивних властивостей, не виявляє шкірно-подразнюючої дії на неушкоджену шкіру щурів, місцево-подразнюючої дії на неушкоджену слизову оболонку ока кролів, не викликає алергічних реакцій у морських свинок, не володіє ульцерогенною дією у щурів. Подальшими дослідженнями встановлено, що курсове введення «Ангіоліну» в дозі 50 мг/кг внутрішньошлунково щурам з інфарктом міокарда призводило до нормалізації показників ЕКГ – зменшення ЧСС, зниження ST, а також поліпшення гістологічної картини міокарда – зменшення зони некрозу, зниження щільності апоптичності і некротичні зміни клітин, підвищення щільності ядер кардіоцитів, підвищення в них РНК, а також підвищення щільності ендотеліоцитів в судинній стінці коронарних судин. Курсове введення «Ангіоліну» в дозі 50 мг/кг внутрішньошлунково щурам з інфарктом міокарда, призводило до нормалізації енергетичного метаболізму серця – збільшення продукції АТФ за рахунок інтенсифікації аеробних реакцій (підвищення рівня пірувату, ізоцитрату) і компенсаторної активації малат-аспартатного шунта (підвищення активності малатдегідрогенази та рівня малату), зниження анаеробного гліколізу (зниження лактату), нормалізації функції мітохондрій (підвищення активності мітохондріальної креатинфосфокінази). Курсове введення Ангіоліну щурам з інфарктом міокарда призводило до нормалізації співвідношення тіол-дисульфідної системи і системи оксиду азоту в міокарді – підвищувалась активність NO-синтази, знижувався вміст нітротирозину, підвищувались вміст відновлених тіолів, цистеїну і активність глутатіонредуктази [246, 327]. Курсове введення ангіоліна щурам з інфарктом міокарда призводило до підвищення активності ферментів супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і зниження маркерів окисної модифікації білка [35, 87]. Курсове введення протягом 4 діб Ангіоліну в дозі 50 мг/кг внутрішньочеревино щурам з церебральною

ішемією призводило до підвищення щільності ендотеліоцитів капілярної мережі кори головного мозку і судинної стінки судин мозку і підвищувало вміст РНК в ендотеліоцитах. Курсове введення протягом 21 доби Ангіоліну в такій самій дозі щурам з церебральною ішемією призводило до підвищення щільності ендотеліоцитів капілярної мережі кори головного мозку і судинної стінки судин мозку і підвищувало вміст РНК в ендотеліоцитах, а також збільшувало щільність проліферуючих ендотеліоцитів в цих судинах. Також введення Ангіоліну протягом 21 доби підвищувало концентрацію фактора росту ендотелію (VEGF) в капілярній мережі і в судинах мозку. Курсове введення Ангіоліну протягом 21 доби в дозі 50 мг/кг внутрішньошлунково щурам з церебральною ішемією призводило до підвищення щільності нейронів IV-V шарів кори головного мозку, підвищення вмісту РНК в нейронах, до зменшення апоптичних і деструктивно змінених нейронів на 4-у і 21-у добу експериментальної терапії. Профілактичне одноразове введення Ангіоліну в дозі 50 мг / кг внутрішньочеревинно підвищувало толерантність до фізичних навантажень, покращувало енергетичний метаболізм міокарда, зменшувало ішемічні зміни серця, а також гальмувало окислювальну модифікацію білка. Профілактичне одноразове введення Ангіоліну (50 мг/кг внутрішньочеревинно) на фоні коронароспазму, викликаного пітуїтрином, підвищувало толерантність до фізичних навантажень на 70%, покращувало енергетичний метаболізм міокарду, зменшувало ішемічні зміни серця, а також гальмувало окислювальну модифікацію білка [102, 316].

Профілактичне одноразове введення Ангіоліну в дозі 50 мг/кг внутрішньошлунково щурам з оклюзією низхідної коронарної артерії призводило до зменшення зони некрозу, зниження ST на ЕКГ, зменшення гіперферментемії МВ-КФК, поліпшення енергетичного метаболізму міокарда, гальмування окисної модифікації білка. Профілактичне одноразове введення Ангіоліну в дозі 50 мг/кг внутрішньовенно кролям з гострою ішемією міокарда призводило до усунення дисфункції лівого шлуночка, що виражалось у збільшенні робочого індексу лівого шлуночка і робочого

ударного індексу лівого шлуночка, підвищення тиску в лівому шлуночку, а також систолічного тиску протягом 20 хвилинної ішемії.

У НВО «Фарматрон» була розроблена нова лікарська форма Ангіоліну – таблетки, вкриті оболонкою.

Описані вище властивості L-лізину, L-лізину есцинату, (S)-2,6діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату (Ангіоліну) і N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду теоретично обґрунтовують перспективність вивчення їх нейропротективних властивостей при хронічній алкогольній інтоксикації, що і визначає актуальність дослідження [209].

Узагальнення і аналіз накопичених відомостей свідчать про те, що на даний момент часу є і застосовуються специфічні препарати для лікування уражень ЦНС при алкогольній хворобі. Разом з тим висока смертність та інвалідизація хворих вказують, що ці засоби фармакотерапії не є повною мірою ефективними. Це обумовлено поліпатогенністю алкогольної хвороби. Виходячи з цього, пошук та розробка нових засобів фармакокорекції алкогольного ураження головного мозку з політропними фармакологічними ефектами серед нових похідних L-лізину: L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, (S) -2,6діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату (Ангіолін) і N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду є актуальними [139, 264].

Розділ 2. Матеріали і методи дослідження

Всі дослідження виконані на достатній кількості експериментальних тварин. Всі маніпуляції були проведені згідно з положенням про використання тварин в біомедичних дослідах (Страсбург, 1986 р., зі змінами, внесеними в 1998 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001), які узгоджені з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей». Протоколи експериментальних досліджень і їх результати затверджені рішенням Комісії з біоетики ЗДМУ (протокол № 8 від 23 листопада 2017 р.)

2.1. Характеристика експериментальних тварин, які були використані в дослідженнях

Досліди виконані на 410 білих безпородних щурах масою 190-220 г, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин становила 14 днів. Протягом карантину проводили щоденний огляд кожної тварини (поведінку і загальний стан), двічі в день проводили догляд за тваринами в клітках (захворюваність і смертність). Перед початком дослідження тварини, що відповідають критеріям включення в експеримент, були розподілені на групи за допомогою методу рандомізації. Тварини, які не відповідають критеріям, були виключені з дослідження протягом карантину. Клітки з тваринами були поміщені в окремі кімнати. Світловий режим: 12 годин – світло, 12 годин – темрява. Температура повітря підтримувалася в межах 19-25 °С, відносна вологість – 50-70%. Температура і вологість повітря реєструвалися щодня. Було встановлено режим провітрювання, що забезпечує близько 15 об'ємів приміщення на годину. Піддослідних тварин утримували на однакових раціонах, в звичайних умовах віварію [94].

Тварини розміщалися в стандартних клітках по 5 осіб в клітці. Раціон харчування – фуражне зерно, хліб, коренеплоди (буряк, морква).

2.2. Характеристика експериментальних моделей, які були використані в дослідженнях для оцінки нейропротективної активності досліджуваних препаратів

Модель гострої алкогольної інтоксикації

Модель гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ) створювали шляхом одноразового інтрагастрального введення 25% розчину етанолу з розрахунку 22,4 г/кг. Цю кількість етанолу вважають дозою високої токсичності (такою вважають 0,8 ЛД₅₀) [149]. Дана модель супроводжується психо-неврологічними змінами, а також патобіохімічними і морфогістологічними порушеннями головного мозку. Досліджувані препарати вводили тваринам через 30 хв. після введення алкоголю (лікувальний режим введення) внутрішньочеревинно одноразово: Ангіолін ((S) -2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, (субстанція, отримана на ДП «Завод хімічних реактивів», м. Харків (сертифікат якості № 1, серія № 010713) (2,5% розчин приготовлений у лабораторних умовах НВО «Фарматрон») – 50 мг/кг [316], L-лізину гідрохлорид (Sigma, USA, Cat. No L5626) – 100 мг/кг, L-лізину есцинат (Корпорація «Артеріум», Україна) – 0,5 мл/кг (1 мг/мл: 5 мл в ампулах) [5], L-NIL (N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид), (Cat. No. 1139, Tocris Bioscience, UK) – 20 мг/кг [39]. Як референс-препарат застосовували Мілдронат (100 мг/кг, 10% розчин для ін'єкцій в ампулах), АО «Гріндекс» (Латвія), який широко застосовується при порушеннях нервової системи у хворих на хронічний алкоголізм [17, 217].

Нейропротективну дію досліджуваних сполук оцінювали за впливом на індекс тяжкості неврологічних порушень (ІТНП) і по зниженню маркерів оксидативного стресу.

У цій серії експерименту було сім груп тварин:

1. інтактні (10 щурів);
2. контрольні – неліковані з гострою алкогольною інтоксикацією (ГАІ), отримували фіз. р-ин (10 щурів);
3. тварини з ГАІ, які одержували «Ангіолін» ((S) -2,6діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат) (10 щурів);
4. тварини з ГАІ, які одержували L-NIL (N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид) (10 щурів);
5. тварини з ГАІ, які одержували L-лізину есцинат (10 щурів);
6. тварини з ГАІ, які одержували L-лізину гідрохлорид (10 щурів);
7. тварини з ГАІ, які одержували Мілдронат (10 щурів).

На моделі ГАІ також проводили більш повну оцінку нейропротективної дії найбільш активного з'єднання – Ангіоліну при лікувальному і профілактичному режимах введення за такими показниками, як попередження когнітивно-мнестичних порушень, а також щодо зниження загибелі нейронів гіпокампу та зменшення нейроаптозу. У цій серії експерименту було 6 груп тварин:

1. інтактні (10 щурів);
2. контрольні – неліковані з гострою алкогольною інтоксикацією (ГАІ), отримували фіз. розчин (10 щурів);
3. тварини з ГАІ, які одержували Ангіолін, в дозі 50мг/кг, лікувальний режим (10 щурів);
4. тварини з ГАІ, які одержували Мілдронат, в дозі 100мг/кг, лікувальний режим (10 щурів);
5. тварини з ГАІ, які одержували Ангіолін, в дозі 50мг/кг, профілактичний режим (10 щурів);
6. тварини з ГАІ, які одержували Мілдронат, в дозі 100мг/кг, профілактичний режим (10 щурів).

Модель хронічної алкогольної інтоксикації у щурів

Лікувальний режим введення препаратів

Хронічну алкогольну інтоксикацію викликали щоденним внутрішньошлунковим введенням перші 10 днів – 15% розчину етанолу в дозі 4 г/кг, наступні 10 днів – 15% розчину етанолу в дозі 6 г/кг, і наступні 10 днів щурам вводили 25% розчин етанолу в дозі 4 г/кг. З 30 доби припиняли алкоголізацію, проводили експериментальну терапію досліджуваними препаратами і продовжували спостереження протягом 14 днів [33, 223].

У цій серії експерименту досліджувані препарати вводили 1 раз на добу протягом 14 діб після 30-добової алкоголізації внутрішньошлунково у вигляді суспензії, стабілізованої Твін-80, за допомогою металевого зонда: Ангіолін в дозі 100 мг/кг, мілдронат – 250 мг/кг [301]. У цій серії експерименту було чотири групи тварин:

- 1) інтактні (10 щурів);
- 2) контрольні - неліковані з хронічною алкогольною інтоксикацією (ХАІ), отримували фіз. розчин з твін-80 (20 щурів);
- 3) тварини з ХАІ, які одержували Ангіолін (20 щурів);
- 4) тварини з ХАІ, які одержували Мілдронат (20 щурів).

Профілактичний режим введення препаратів

Хронічну алкогольну інтоксикацію викликали щоденним внутрішньошлунковим введенням перші 10 днів – 15% розчином етанолу в дозі 4 г/кг, наступні 10 днів – 15% розчином етанолу в дозі 6 г/кг, і наступні 10 днів щурам вводили 25% розчин етанолу в дозі 4 г/кг.

У цій серії експерименту досліджувані препарати вводили 1 раз на добу за 60 хв. до введення етанолу протягом 30 діб внутрішньошлунково у вигляді суспензії, стабілізованої Твін-80, за допомогою металевого зонда: Ангіолін в дозі 100 мг/кг, мілдронат – 250 мг/кг [163]. У цій серії експерименту було чотири групи тварин:

- 1) інтактні (10 щурів);

2) контрольні – неліковані з хронічною алкогольною інтоксикацією (ХАІ), отримували фіз. розчин з твін-80 (20 щурів);

3) тварини з ХАІ, які одержували Ангіолін (20 щурів);

4) тварини з ХАІ, які одержували Мілдронат (20 щурів).

В роботі використовувалися: Ангіолін (субстанція, отримана на ДП «Завод хімічних реактивів», м. Харків (сертифікат якості № 1, серія № 010713), таблеткова маса, приготовлена у лабораторних умовах НВО «Фарматрон»), та Мілдронат – в капсулах по 250 мг виробництва АТ «Гриндекс» (Латвія).

Після закінчення експерименту, згідно з протоколом дослідження кожної моделі, тварини наркотизувалися тіопенталом натрію (40 мг/кг), у них розкривалася грудна клітка, забиралася кров з черевної аорти і головний мозок.

2.3. Обґрунтування вибору ефективної дози розчину таблеток «Ангіолін»

Ефективну дозу таблеток «Ангіолін» визначали на моделі гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ).

За 60 хв. до введення етанолу тваринам внутрішньошлунково одноразово вводили суспензію таблеткової маси Ангіоліну в дозах: 25 мг/кг; 50 мг/кг; 100 мг/кг; 150 мг/кг; 200 мг/кг; 250 мг/кг. У цій серії експерименту було вісім груп тварин:

1) інтактні (10 щурів);

2) контрольні – неліковані з гострою алкогольною інтоксикацією (ГАІ) (10 щурів);

3) тварини з ГАІ, які одержували Ангіолін в дозі 25 мг/кг (10 щурів);

4) тварини з ГАІ, які одержували Ангіолін в дозі 50 мг/кг (10 щурів);

5) тварини з ГАІ, які одержували Ангіолін в дозі 100 мг/кг (10 щурів);

6) тварини з ГАІ, які одержували Ангіолін в дозі 150 мг/кг (10 щурів);

- 7) тварини з ГАІ, які одержували Ангіолін в дозі 200 мг/кг (10 щурів);
- 8) тварини з ГАІ, які одержували Ангіолін в дозі 250 мг/кг (10 щурів).

Через 24 години після введення етанолу тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). У тварин забирався головний мозок. У цитозольній фракції гомогенату головного мозку визначали показники систем NO і відновлених тіолів - нітротирозину, відновлений глутатіон і активність глутатіонпероксидази (ГПР) [11]. Ефективна терапевтична доза таблеток Ангіолін при внутрішньошлунковому введенні визначалася після побудови кривої «доза – ефект» методом регресійного аналізу з використанням програми Statistica 6 по визначеним біохімічним показникам.

2.4. Гістохімічні методи дослідження

Для гістохімічних досліджень головний мозок на 24 години фіксували в рідині Карнуа і далі за стандартною схемою заливали в блоки парапластом-Х100, з яких готували серійні фронтальні 14-мікронні гістологічні зрізи в області сенсомоторної кори.

Для визначення інтенсивності експресії ендотеліального фактору росту (vascular endothelial growth factor, VEGF) гістологічні зрізи мозку виділяли з парапласта і регідрували, тричі по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН = 7,4) і протягом 30 хвилин інкубували з 2н соляною кислотою ($t = 37^{\circ}C$). Потім двічі по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН = 7,4), двічі по 5 хвилин відмивали боратним буфером по Холмсу (рН = 8,4) і чотири рази по 5 хвилин - фосфатним буфером (рН = 7,4), після чого протягом 30 хвилин інкубували з 0,1% розчином трипсину в фосфатному буфері ($t = 37^{\circ}C$). Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН = 7,4) і потім протягом 24 годин інкубували у вологій камері ($t = 4-6^{\circ}C$) з первинними поліклональними антитілами IgG1 миші до VEGF щура/людини (клон СН-10), виробництва Chemicon (Кат. № МАВ1665).

Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН = 7,4). Потім протягом 1 години ($t = 37^{\circ}\text{C}$) інкубували з вторинними антитілами кози до фрагменту IgG кролика, кон'югованими з флуоресцентним барвником (FITC) фірми Sigma-Aldrich (Кат.№ F 2266). Після заключного чотириразового відмивання фосфатним буфером (рН = 7,4) зрізи укладали в суміш гліцерин-фосфатний буфер (9:1). На флуоресцентному мікроскопі Axioskop (Ziess, Germany) визначали інтенсивність експресії VEGF по щільності VEGF-позитивних клітин в зрізах за допомогою відеокамери COHU – 4922 (USA) і вводили в систему цифрового аналізу зображення VIDAS – 386 (Kontron Elektronik, Germany). При цьому вираховували концентрацію VEGF в досліджуваній тканині (одиниці оптичної щільності, ЕІФ), яку розраховували як логарифм відношення статистично значущої інтенсивності флюоресценції до флюоресценції міжклітинної речовини [95].

2.5. Біохімічні методи дослідження

З головного мозку швидко видаляли кров, відокремлювали від мозкової оболонки і досліджувані шматочки поміщали в рідкий азот. Потім подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища при (2°C), що містить (в ммоль): сахарози – 250, трис-НСІ-буфера – 20, ЕДТА-1 (рН 7,4) [261]. При температурі ($+ 4^{\circ}\text{C}$) методом диференціального центрифугування на рефрижераторній центрифугі Sigma 3-30k (Німеччина) виділяли мітохондріальну фракцію. Для очищення мітохондріальної фракції від великих клітинних фрагментів попередньо проводилося центрифугування протягом 7 хвилин при 1000g, а потім супернатант повторно центрифугували протягом 20 хвилин при 17000g. Супернатант зливали і зберігали при -80°C . Осад мітохондрій ресуспендували в середовищі виділення, що містить бичачий сироватковий альбумін (0,5 мг/мл) і знову осаджували протягом 10 хвилин при 17000 g.

Мітохондрії суспендували в середовищі виділення, суспензія містила 40-60 мг білка/мл. Для тривалого зберігання мітохондрії заморожують при -80°C . Для визначення швидкості відкриття мітохондріальної пори використовували суспензію 0,5-1,0 мг білка/мл.

Безбілковий екстракт отримували додаванням точного навішування гомогенату тканини мозку в хлорній кислоті (0,6) з наступною нейтралізацією 5,0м калію карбонатом [163].

Для оцінки інтенсивності оксидативного стресу визначали маркери окисної модифікації білка – альдегідфенілгідразону (АФГ) і карбоксифенілгідразону (КФГ), а також нітротирозину [94]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю СОД, каталази [340]. Стан енергетичного обміну визначали за рівнем найбільш значущих інтермедіатів – АТФ, АДФ, АМФ, лактату, пірувату, малату [291]. Про продукцію, метаболізм та транспорт NO судили за активністю NO-синтази (NOS), вмістом нітротирозину, нітратів, рівню L-аргініну [96, 289].

Визначення активності СОД проводили за методикою, описаною Чеварі зі співавторами із застосуванням феназінметансульфату і нітросинього тетразолію [95]. СОД конкурує з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидрадикали, що утворюються в результаті аеробної взаємодії НАДН і феназінметасульфату (ФМС). В результаті цієї реакції НСТ відновлюється до гідразинтетразолія. У присутності СОД відсоток відновлення НСТ змінюється. Активність каталази визначали спектрофотометрично [94]. Каталаза, що знаходиться в пробі, розкладає перекис водню, залишок перекису визначали за реакцією з молібдатом амонію. Активність ферменту оцінювали за ступенем розкладання перекису водню. Активність глутатіонпероксидази (ГПР) визначали за методикою [96]. ГПР відновлює за допомогою глутатіону відновленого гідроперекис трет-бутилу. Залишок відновленого трет-бутилу визначали за інтенсивністю забарвлення з нітропрусидом натрію, що має максимум поглинання при

довжині хвилі 540 нм. Активність ГПР оцінювали по спаданню глутатіону відновленого.

Вміст L-аргініну в цитоплазмі головного мозку визначали методом тонкошарової хроматографії з наступною спектрофотометрією [291]. Метод заснований на поділі в системі пропаном : аміак на тонкому шарі сорбенту з подальшою елюацією ДМФА, забарвленням алоксаном і спектрофотометрією забарвлених комплексів при 540 нм [96]. Стабільні метаболіти NO визначали за рівнем нітратів в реакції Грісса [95]. Принцип методу полягає в тому, що стабільні метаболіти монооксиду азоту – нітриту, реагуючи з реактивом Грісса, утворюють стійкий забарвлений комплекс, який має максимум поглинання при довжині хвилі 540 нм [157].

Активність NOS визначали за різницею між швидкістю окислення NADPH. В основі методу визначення загальної активності NO-синтази лежить стехіометричне окислення НАДФН в процесі реакції утворення NO з L-аргініну. Спад НАДФН, еквімолярна кількості NO що утворюється, яку реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм. Для доказу того, що швидкість окислення NADPH може служити показником активності NOS, використовують додаткові проби, в які вносять інгібітор NOS- N-нітро-L-аргінін (1мМ) [261].

Показники окисної модифікації білка (ОМБ) визначалися за методом В. Halliwell [291] по взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) і утворенням альдегідфенілгідразону (АФГ) і карбоксифенілгідразону (КФГ), що мають спектр поглинання при 274 нм 363 нм відповідно. Кількість малата визначали за методом Хохорста по убутанню НАДН при 340 нм [94]. Метод полягає в тому, що в присутності малатдегідрогенази (МДГ) малат перетворюється в щавлевооцтову кислоту. Зв'язування щавелевооцтової кислоти гідразин-гліцериновим буфером забезпечує повне окислення малату. Утворення відновленої форми НАДН еквівалентно кількості окисленого малату, наростання якого реєструють при 340 нм. Вміст пірувату визначали за методом Цоха-Ломпрехта [340].

Принцип методу полягає в тому, що в присутності лактатдегідрогенази (ЛДГ) піруват відновлюється до лактату. Кількість використовуваного в реакції пірувату еквівалентно кількості НАДН, спад якого визначається при 340 нм. Вміст лактату визначали за методом Хохорста [261]. Принцип методу полягає в тому, що в присутності лактатдегідрогенази (ЛДГ) лактат переходить в піруват, причому зв'язування утвореного в ході реакції пірувату гідразин-гліциновим буфером сприяє повному окисненню лактату. Утворення відновної форми НАД еквівалентне кількості окисленого лактату, наростання якого реєструють при 340 нм. Аденілові нуклеотиди визначали методом тонкошарової хроматографії. Метод заснований на поділі АТФ, АДФ і АМФ в системі діоксан-ізопропанол-вода-аміак на тонкому шарі сорбенту з подальшим кількісним визначенням прямою спектрофотометрією при 260 нм [262]. Концентрацію ГАМК, гліцину і глутамату визначали методом тонкошарової хроматографії. Метод заснований на поділі гліцину, ГАМК і глутамату в системі н-бутанол: оцтова кислота: вода на тонкому шарі сорбенту з подальшою елюацією ДМФА, забарвленням алоксаном і спектрофотометрією забарвлених комплексів при 540 нм [51]. Активність глутаматдекарбоксилази (ГДК) визначали по зміні кількості НАДФ при 340 нм, яка еквімолярна кількості субстрату (глутамінової кислоти), використаного в реакції [55]. Концентрацію білка оцінювали за методом Бредфорда. Нітритрозин визначали в цитозольній фракції гомогенату серця твердофазним іммуносорбентним сендвіч-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. № НК 501-02) фірми Hycult Biotech, що виражалось в нм/г тканини.

2.6. Морфологічні методи дослідження

Для морфологічних досліджень по завершенні експерименту головний мозок витягували на добу в фіксатор Буена і після стандартної гістологічної проводки тканину укладали в парафін [163].

Для вивчення морфології нейронів на ротаційному мікроскопі виготовляли зрізи СА-1 зони гіпокампу і сенсомоторної кори товщиною 5 мікрон. Зрізи гіпокампу депарафінували і фарбували для визначення нуклеїнових кислот галлоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном [291]. Морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина), збільшення $\times 40$. Зображення нейронів в області зони СА-1 гіпокампу, отримані на мікроскопі за допомогою високочутливої відеокамери СОНУ-4922 (СОСНУ Inc., США) вводили в комп'ютерну програмно-апаратну систему цифрового аналізу зображення VIDAS, розроблену професором кафедри патофізіології, д.мед.н. А. В. Абрамовим. Аналіз зображень проводили в напівавтоматичному режимі [96].

Визначали наступні показники:

- щільність нейронів, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (кількість клітин на 1мм^2 площі зрізу кори мозку),
- клітинний склад в області IV-V шарів кори і СА1 зони гіпокампу у відсотках,
- площа тіл нейронів, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (мкм^2),
- вміст РНК в нейронах, апоптотичних і деструктивно змінених нейронах (одиниці оптичної щільності, ООЩ), який розраховували як логарифм відношення оптичної щільності тіла клітини до оптичної щільності міжклітинної речовини,
- індекс відношення кількості нейронів, що вижили, до числа апоптотичних і деструктивно змінених нейронів.

Дегенеруючими вважалися нейрони, що мають ознаки каріопікнозу або цитолізу. Програмно вимірювались: щільність розташування нейронів, що вижили і дегенеруючих нейронів, співвідношення числа інтактних нейронів до загіблених (індекс нейродегенерації) і відношення щільності нейронів, що вижили, при використанні препарату до щільності інтактних нейронів в контрольній групі (індекс поліпшення виживаності). Так як частина загіблених

нейронів до моменту гістологічного дослідження вже була фагоцитована клітинами мікроглії, окремо оцінювався індекс відносної активності мікроглії, рівний частці від ділення різниці в щільності нейронів, що вижили, на різницю в щільності дегенеруючих нейронів. Величина індексу нейродегенерації менш одиниці свідчила про переважання числа загиблих нейронів над тими, що вижили, індекс поліпшення виживаності і активності мікроглії більше одиниці свідчив про позитивну дію фармакологічного препарату, менше одиниці - про негативний [71, 320]. Про функціональний стан нейронів, що вижили, судили на підставі зміни площі ядер і ядерць нейронів, вмісту в них нуклеїнових кислот, ядерно-цитоплазматичного співвідношення і кількості багатоядерних клітин.

Для вивчення морфофункціонального стану ендотеліоцитів капілярів IV-V шарів кори і стінки судин судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок центральної мозкової і очної артерій (далі по тексту: судин головного мозку) гістологічні зрізи депарафінізували за стандартною методикою і фарбували галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном для специфічного виявлення РНК [97]. Для ендотеліальних клітин судин визначали наступні показники:

- площа ядра;
- середній діаметр ядра, а саме, мінімальний еліптичний діаметр (тому що ядро ендотеліальної клітини судин в поперечному розмірі має форму сильно витягнутого еліпса);
- концентрацію РНК в ядрі (одиниці оптичної щільності, ООЩ), яку розраховували як логарифм відношення оптичної щільності ядра до оптичної щільності міжклітинної речовини;
- щільність ядер ендотеліоцитів як кількість клітин на 1мм^2 площі зрізу кори мозку в області IV-V шарів кори, і стінки судин судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок центральної мозкової і очної артерій.

Для визначення проліферуючих ендотеліоцитів гістологічні зрізи головного мозку депарафінізували і регідрували, тричі по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН = 7,4) і протягом 30 хвилин інкубували з 2Н соляною кислотою ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Потім двічі по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН = 7,4), двічі по 5 хвилин відмивали боратним буфером за Холмсом (рН = 8,4) і чотири рази по 5 хвилин - фосфатним буфером (рН = 7,4), після чого протягом 30 хвилин інкубували з 0,1% розчином трипсину в фосфатному буфері ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН = 7,4) і потім протягом 24 годин інкубували у вологій камері ($t = 4\text{-}6\text{ }^{\circ}\text{C}$) з моноклональними антитілами миші до 5-бромо-2'-деоксиуридину (anti- BrdU, клон BU-33) виробництва Sigma-Aldrich (Кат.№ В8434). Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хвилин відмивали фосфатним буфером (рН = 7,4) і потім протягом 1 години ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) інкубували з вторинними антитілами вівці до F (АВ ') 2 фрагменту IgG миші, кон'югованими з флуоресцентним барвником FITC виробництва Sigma-Aldrich (Кат.№ F2266). Після заключного чотирикратного відмивання фосфатним буфером (рН = 7,4) зрізи укладали в суміш гліцерин-фосфатний буфер (9: 1) [97].

Аналіз гістологічних зрізів проводили на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина) в ультрафіолетовому світлі. Для отримання флуоресцентного зображення ядер ендотеліоцитів використовували високоемісійний фільтр 38HE фірми Zeiss (кат. № 489038-0000) з діапазоном збудження 450-490 нм, діапазоном емісії 500-550 нм, і спеціалізований об'єктив із широкою апертурою Fluor 40x/1.30 Oil фірми Zeiss (кат .№ 440260-9900). Зображення за допомогою 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) і обробляли в автоматичному режимі за допомогою макро-програми, розробленої в спеціалізованому середовищі програмування VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина).

2.7. Вестернблотінг

Концентрацію в цитоплазматичній фракції органів головного мозку bcl-2 визначали методом Вестерн-блот аналізу. Білки розділяли в 10% поліакриламідному гелі (ПААГ). Поділ білкових фракцій проводився шляхом електрофорезу при напрузі 100 V (для ущільнення гелю), коли проби досягали межі розділу гелів - при напрузі 200 V, до того часу, поки проби не досягли закінчення гелю.

Білок з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану при напрузі 100 V і силі струму 0,35 A протягом 1 години. Після перенесення мембрану поміщали в блокуючий буфер, що містить 1% розчин бичачого сироваткового альбуміну (SIGMA, USA, кат. № A2153) на 20 годин. Відмиту на шейкері протягом 5 хв у розчині 0,1Мфосфатного буфера мембрану поміщали в розчин первинних антитіл проти bcl-2 (1: 500), (Santa Cruz Biotechnology) і інкубували 2 години при кімнатній температурі. Відмивали на шейкері 4 рази по 5 хвилин в 0,1Мфосфатному буфері. Поміщали мембрану в розчин вторинних антитіл (1: 1000), (біотинілований антимишачий IgG, SIGMA, USA, кат. №051M4885), інкубували 2 години. Відмивали на шейкері 4 рази по 5 хвилин в розчині 0,1М фосфатного буфера. Поміщали мембрану в розчин ExtrAvidin-пероксидази (SIGMA, USA, кат. №051M4885) в 1% розчині бичачого сироваткового альбуміну (1: 1000). Інкубували 1 годину і промивали. Для візуалізації мембрану обробляли розчином АЕК: 1 таблетка 3-аміно-9-етилкарбазола (Sigma, USA, кат. № a6926), розчинена в 2,5 мл ДМФА, що містить 47,5 мл 0,05М ацетатного буфера, рН 5,0, 25мкл 30% H₂O₂. Інкубували мембрану в субстратній суміші 5-10 хв. Червоний нерозчинний преципітат характеризує комплекс антиген-антитіло в блоті. Промивали мембрану в дистильованій воді кілька разів. Висушували смужки між листами фільтрувального паперу під потоком холодного повітря. Детекцію bcl-2 здійснювали за допомогою денситометрії в програмі Adobe Photoshop.

2.8. Фармакологічні методи

Вираженість гострого отруєння етанолом оцінювали за «бальною системою» [340]. Для оцінки ступеня пригнічення функціонування ЦНС при дії етанолу розраховували індекс тяжкості неврологічних порушень (ІТНП) [204]. ІТНП в балах відображає стан експериментальних тварин, відповідний ступеню гострої алкогольної інтоксикації у людини: понад 55 балів – рівень фізіологічної норми; від 46 до 55 балів – оглушення; від 36 до 45 балів – сопор; від 26 до 35 балів – кома помірна; від 18 до 25 балів – кома глибока; термінальна кома – 17 балів і менше.

Неврологічний дефіцит у тварин визначали за шкалою Stroke-index С.Р. McGraw в нашій модифікації [94]. Важкість стану визначалася за сумою відповідних балів. Визначалася кількість тварин з легкою симптоматикою до 2,5 балів за шкалою Stroke-index (млявість рухів, слабкість кінцівок, односторонній напівптоз, тремор, манежні рухи) і важкими проявами неврологічних порушень (від 3 до 10 балів) – парези кінцівок, параліч нижніх кінцівок, бокове положення (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Неврологічний симптом	<i>Stroke index:</i>
Млявість, сповільненість рухів	0,5
тремор	1,0
односторонній напівптоз	1,0
двосторонній напівптоз	1,5
слабкість кінцівок	1,5
односторонній птоз	1,5
двосторонній птоз	1,5
манежні рухи	2,0
Парез 1-4 кінцівок	2,0-5,0
Параліч 1-4 кінцівок	3,0-6,0
коматозний стан	7,0
смерть	10,0

Антиамнестичну активність досліджуваних препаратів оцінювали за збереженням у щурів аверсивного стимулу в тесті умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ).

Після закінчення експериментальної терапії тварин навчали в двохкамерній установці, що складається з двох відсіків - світлого і темного. Щура поміщали в темний відсік, фіксували латентний час заходу в темний відсік, де щур отримував удар струмом і вибігав в світлий відсік. Відтворення УРПУ перевіряли через 24 години. Про активність сполук судили по зміні латентного часу заходу щура в темний відсік в порівнянні до контролю (тварина без введення досліджуваних речовин) [262].

Також оцінювалися реакції орієнтовно-дослідної поведінки в тесті «відкрите поле» [95]. Процедура включає підготовчий період і власне тестування. У тесті відкрите поле реєстрували горизонтальну і вертикальну рухову активність, грумінг, обнюхування отворів, дефекацію. За 60 хвилин до тестування тварин поміщали в тихе, слабо освітлене приміщення. У цей період повністю виключалося годування тварин, взяття їх в руки і інші активні маніпуляції, щоб похибка досліду мала систематичний характер.

Дослідження проводили в камері (100x100) з пластмасовими стінками заввишки 40 см і підлогою з пластика бежевого кольору, поділеного на квадрати чорною фарбою на 25 (5x5) рівних квадратів. Тварину поміщали в кут камери мордочкою до стінки, після чого їй протягом 3 хвилин дозволяли вільно переміщатися по арені. Оцінювали горизонтальну (число пересічених квадратів), вертикальну (число «стійок») і дослідницьку (число заглядань в «нірки») активність, кількість замирань і входжень в центр, кількість подій грумінга, кількість актів дефекації і урінації [97].

2.9 Токсикологічні методи

Визначення гострої токсичності нової сполуки Ангіолін проводили за методом Кербера в модифікації А.О. Лойт і М.Ф. Савченкова [95],

використовуючи класифікацію К.К. Сидорова. Для встановлення середньосмертельної дози (LD_{50}) досліджуваної сполуки, її вводили внутрішньошлунково у вигляді водного розчину з допомогою металевго зонда, а також внутрішньочеревинно, одноразово 5 групам (при кожному шляху введення) лабораторних тварин (безпородні білі щурі, миші), по 6 голів у кожній. Вводили кілька доз Ангіоліну, включаючи дозу, яка не викликає загибелі жодної тварини, і дозу, що викликає загибель всіх тварин в групі [98, 205]. Після введення Ангіоліну за рештою живих тварин вели спостереження протягом двох тижнів.

Розрахунок проводили за формулою:

$$LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum(Z \cdot d)}{n},$$

де: Z – середня арифметична величина, отримана від ділення на 2 кількості загиблих від двох суміжних доз;

d – інтервал між двома дозами, що стоять поруч;

n – число тварин для кожної дози.

По закінченню двох тижнів спостереження тварини, що загинули, і живі тварини піддавалися патологоанатомічному дослідженню.

2.10. Статистичні методи дослідження

Результати дослідження розраховували із застосуванням стандартного статистичного пакету ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Shapiro-Wilk. Дані представлені у вигляді середнього значення. Для порівняння незалежних змінних застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі або критерій Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності $p < 0,05$ (95%).

Розділ 3. Оцінка нейропротективної дії похідних L-лізину в умовах гострої алкогольної інтоксикації

3.1 Дослідження нейропротективної дії похідних L-лізину в умовах гострої алкогольної інтоксикації

Останнім часом все більше привертає до себе увагу в нейрофармакології L-лізин і його похідні. L-лізин за допомогою перетворення в піпеколієву кислоту підвищує афінність ГАМК бензодіазепін-рецепторного комплексу, знижує трансмітерний аутокоідоз і проявляє властивості ендогенного антиконвульсанта, нейропротектора і анксиолітика. Заслужують на увагу і похідні L-лізину, а саме: L-лізину гідрохлорид, L-лізину есцинат, розроблений в НВО «Фарматрон» (Україна) (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) і N-6-(1-іміноетил)-L-лізину дигідрохлорид (селективний інгібітор iNOS) [4, 24, 73, 203, 348], що проявляють нейропротективні властивості на моделях церебральної ішемії і інтрацеребральних крововиливів [107, 137, 177].

Вищевикладене обґрунтовує перспективність вивчення нейропротективної активності похідних L-лізину в умовах пошкодження алкоголем головного мозку. З цією метою нами була проведена порівняльна оцінка нейропротективної дії похідних L-лізину, а саме: L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, (S)-2,6 діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетата (Ангіолін) і N-6-(1-іміноетил)-L-лізину дигідрохлориду при моделюванні гострої алкогольної інтоксикації, щоб визначити найбільш перспективну сполуку і експериментально обґрунтувати її подальші дослідження в умовах хронічної алкогольної інтоксикації [5, 30, 77, 208, 248].

Завдяки моделюванню гострої алкогольної інтоксикації шляхом одноразового внутрішньошлункового введення щурам 0,8 ЛД₅₀ етанолу, в різні часові проміжки після внутрішньошлункового введення нам вдалося простежити в динаміці зміну поведінкових і неврологічних показників від фізіологічної норми до глибокого пригнічення ЦНС і подальшого, візуально оцінюваного, відновлення стану тварин. Значення індексу тяжкості неврологічних порушень (ІТНП) визначали протягом 36 годин спостереження після введення етанолу в дозі 0,8 ЛД₅₀, у кожної тварини, взятої до експерименту. Дослідження показали, що введення етанолу в субтоксичній дозі призводить до важких неврологічних порушень [204]. Так, через 2 години після введення етанолу у тварин пригнічувались глотковий рефлекс (при натисканні на корінь язика зондом утруднювалися ковтальні рухи), корнеальний рефлекс (при доторку волоском до рогівки ока не спостерігається закриття повік), зіничний рефлекс (відсутня реакція зіниці на світло) і рефлекс згинання задніх кінцівок (при стисканні задньої кінцівки пінцетом не відбувалося її згинання і скорочення черевної стінки). У цій групі тварин пригнічувалась як тактильно-больова чутливість, так і поведінкові реакції – тварини не реагували на звукові подразники, на взяття їх до рук, не переверталися на живіт та не могли самостійно пересуватися [260].

Згідно зі шкалою ІТНП тварини перебували в ступені коми або важкої коми. Так, через 2 години після прийому субтоксичної дози алкоголю ІТНП тварин контрольної групи знизився на 61% в порівнянні з ІТНП інтактної групи і протягом наступних 10 годин був нижче на 50%. Відновлення поведінкової і рефлекторної активності починалося з 24 години після введення алкоголю, але навіть через 36 годин після прийому етанолу нейрофізіологічні показники тварин не досягли значень фізіологічної норми. Так, значення ІТНП контрольної групи і через 24 години і через 36 годин після прийому субтоксичної дози алкоголю залишалися нижче значень інтакту на 30%. Внутрішньошлункове введення Ангіоліну в дозі 50 мг / кг

тваринам з гострою алкогольною інтоксикацією дозволило достовірно зменшити порушення поведінкових і неврологічних показників у різні часові проміжки після прийому субтоксичної дози алкоголю [225, 248].

Результати досліджень представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Індекс тяжкості неврологічних порушень в балах після гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ)

Групи тварин	2 години	5 годин	10 годин	24 годин	36 годин
Інтакт (n=10)	67,6± 0,548	67,6± 0,548	67,6± 0,548	67,6± 0,548	67,6± 0,548
Контроль (ГАІ) (n=10)	26,4± 2,27 (-61%)	29,4± 2,12 (-56,5%)	33,4± 2,87 (-50,6%)	42,7± 3,71 (-36,8%)	47,4± 4,77 (-30%)
ГАІ+Ангіолін, 50 мг/кг (n=10)	34,5± 2,7* ¹ (+31%)	45,7± 3,6* ¹ (+55%)	53,4± 4,1* ¹ (+60%)	58,9± 5,1* (+38%)	65,3± 4,4* (+38%)
ГАІ +N ⁶ -(1-іміноетил) - L-лізину дигідрохлорид - 20 мг/кг(n=10)	29,7± 1,5 (+12%)	38,8± 2,2* ¹ (+32%)	44,3± 3,3* ¹ (+33%)	53,2± 3,2* (+24%)	63,5± 6,2* (+34%)
ГАІ +L-лізину есцинат - 0,5 мл/кг(n=10)	26,8± 2,3 (+2%)	28,3± 3,4 (-4%)	41,9± 3,1* (+25%)	52,7± 3,7* (+23%)	61,8± 5,2* (+30%)
ГАІ +L-лізину гідрохлорид - 100 мг/кг(n=10)	26,2± 3,7 (-1%)	28,8± 2,8 (-2%)	38,8± 4,3 (+16%)	51,3± 4,8 (+20%)	58,8± 4,5* (+24%)
ГАІ + Мілдронат, 100 мг/кг(n=10)	25,5± 3,3 (-3%)	28,3± 4,7 (-4%)	35,7± 5,0 (+7%)	49,1± 5,7 (+15%)	57,8± 5,1* (+22%)

Примітка: * - P < 0,05 по відношенню до контрольної групи;

¹- P < 0,05 по відношенню до групи, що одержувала Мілдронат у відповідному режимі введення.

Так, здійснюючи нагляд в різні часові проміжки за допомогою шкали ІТНП за щурами, які отримали внутрішньошлунково Ангіолін після прийому $0,8LD_{50}$ етанолу, було встановлено, що введення цього препарату достовірно зменшує індекс важкості неврологічних порушень, починаючи з 2 години спостереження (підвищення ІТНП на 31%), з максимальним проявом ефекту на 5-10 годинах спостереження (підвищення ІТНП на 55-60 %). Призначення Ангіоліну відновлювало поведінкові реакції піддослідних щурів після отруєння субтоксичними дозами етанолу - вони швидше реагували на тактильні та звукові подразники, переверталися на живіт, починали самостійно пересуватися. Особливо потрібно звернути увагу та відзначити те, що Ангіолін проявляв достовірну дію відносно ІТНП протягом 10 годин спостереження. Саме в цей період після прийому субтоксичних доз алкоголю (гострий період) найбільш часто спостерігається летальність, що вимагає проведення інтенсивних медикаментозних заходів для порятунку життя пацієнта. Починаючи з 10 години після гострої алкогольної інтоксикації, тварини, яким вводився Ангіолін, згідно з індексом неврологічних порушень перебували в межах фізіологічної норми. У тварин, які отримували Ангіолін, повністю відновлювалися рефлекс згинання задніх кінцівок, ковтальний рефлекс, зіничний рефлекс, корнеальний рефлекс і тактильно-больова чутливість. Тварини, які отримували L-лізину гідрохлорид, L-лізину ессцінат і N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид перебували в межах фізіологічної норми лише через 36 годин після гострої алкоголізації. Отже за силою терапевтичної дії Ангіолін достовірно перевершує ефективність Мілдронату на 2, 5, 10 і 24 годинах спостереження [81, 205].

Введення тваринам з гострою алкогольною інтоксикацією N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду також достовірно зменшувало порушення поведінкових і неврологічних показників у різні часові проміжки після прийому субтоксичної дози алкоголю. Так, введення цього похідного L-лізину призводило, відповідно до шкали ІТНП, до вірогідного зменшення

індексу важкості неврологічних порушень, починаючи з 5 години спостереження (підвищення ІТНП на 32%) і з його збереженням до 36 годин спостереження (підвищення ІТНП на 34%). Через 36 годин після гострої алкоголізації тварини, які одержували N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид, згідно ІТНП, перебували в межах фізіологічної норми. За силою нейропротективної дії N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид на 5 і 10 годинах спостереження також достовірно перевершує Мілдронат. Введення тваринам з гострою алкогольною інтоксикацією L-лізину есцінату надавало достовірну нейропротективну дію, відповідно до шкали ІТНП, починаючи з 10 години спостереження (ІТНП збільшувався в порівнянні з контролем на 33%) зі збереженням цього ефекту до 36 години спостереження. Введення L-лізину тваринам з гострою алкогольною інтоксикацією проявляло достовірний вплив на показник ІТНП тільки на 36 годині спостереження. За силою терапевтичної дії L-лізину есцінат і L-лізину гідрохлорид можна порівняти з ефективністю Мілдронату. Введення Мілдронату тваринам з гострою алкогольною інтоксикацією не робило достовірного впливу на показник ІТНП тварин після вживання субтоксичної дози алкоголю протягом 24 годин, і надавало достовірний вплив на цей показник тільки на 36 годині спостереження [64, 260].

На фоні гострої алкогольної інтоксикації у щурів розвивався оксидативний і нітрозативний стрес, про що свідчило підвищення показників альдегідфенілгідрозонів (АФГ) і кетонфенілгідрозонів (КФГ), а також продуктів нітрозолування білків – нітротирозину в головному мозку. Так, в групі контролю показники АФГ і КФГ підвищилися на 112,5% і 131,2% відповідно в порівнянні з групою інтакту і показники нітротирозину в головному мозку щурів підвищилися в 8,4 рази в порівнянні з групою інтактну [115, 231, 248].

Результати досліджень представлені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Маркери оксидативного і нітрузуючого стресу в головному мозку тварин після гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ) на 3 добу експерименту

Група тварин	Продукти ОМБ, у.о./г білка		Нітротирозин, нмоль/г тканини
	АФГ	КФГ	
Інтакт (n=10)	0,32±0,02	0,16±0,02	15,2±0,85
Контроль ГАІ (n=10)	0,68±0,04	0,37±0,02	128,5±10,2
ГАІ + Ангіолін, 50 мг/кг,(n=10)	0,44±0,03* ¹ (-35%)	0,21±0,011* ¹ (-43%)	61,2±4,4* ¹ (-52%)
ГАІ +N ⁶ -(1-іміноетил) -L- лізину дигідрохлорид – 20 мг/кг, (n=10)	0,50±0,04* (-26%)	0,26±0,03* (-30%)	74,2±4,2* ¹ (-42%)
ГАІ +L-лізину есцінат – 0,5 мл/кг	0,55±0,03* (-19%)	0,29±0,02* (-21%)	88,2±6,1* (-31%)
ГАІ +L-лізину гідрохлорид – 100 мг/кг, (n=10)	0,58±0,06 (-15%)	0,31±0,04 (-16%)	94,2±5,3* (-26%)
ГАІ+Мілдронат, 100мг/кг, (n=10)	0,60±0,07 (-17%)	0,30±0,05 (-19%)	92,5±7,2* (-28%)

Примітка: * – P <0,05 по відношенню до контрольної групи;

¹– P<0,05 по відношенню до групи, що одержувала Мілдронат у відповідному режимі введення.

Оксидативний стрес призводить до пошкодження найбільш важливих полімерів, а саме – нуклеїнових кислот, білків і ліпідів [112]. Так, АФК викликають пошкодження ДНК (окислення основ, їх модифікація, розриви ланцюгів, пошкодження хромосом). В результаті цього знижується, або

зникає їх різноманітна функціональна активність – ферментативна, регуляторна, участь в матричних синтезах, транспорт іонів і ліпідів, та, як результат всього цього – зміна нормального апарату головного мозку, порушення пам'яті і когнітивно-мнестичних функцій [115, 233]. Введення Ангіоліну тваринам з гострим інфарктом міокарда (ГАІ) призводило до достовірного зниження в головному мозку АФГ і КФГ на 35% і 43% відповідно, а також зниження нітротирозину на 52% по відношенню до групи контрольних тварин на 3 добу після алкогольної інтоксикації (табл. 3.2.). Ангіолін проявляв значний вплив на запуск процесів окисної модифікації білкових молекул на фоні важкої гострої алкоголізації тварин, практично наближаючись до показників групи інтакту, що свідчило про значний антиоксидантний ефект препарату [116, 290, 337]. За ступенем впливу на маркери оксидативного і нітрозуючого стресу Ангіолін достовірно перевершує Мілдронат. Захисні ефекти Ангіоліну на тканину мозку включають його оптимізуючий вплив на енергетичний метаболізм і гомеостаз кальцію, стимуляцію внутрішньоклітинного синтезу білка, пригнічення процесів глутамат-кальцієвого каскаду і перекисного окислення ліпідів [38, 54, 253]. Реалізація цих ефектів тісно пов'язана з наявністю в структурі Ангіоліну L-лізину, що забезпечує безпосередній захист нейрона в умовах глутаматної ексайтотоксичності й 1,2,4-триазоліл-5-тіоацета, що підвищує енергетичний та антиоксидантний статус клітини [231]. Значну інгібуючу дію на реакції оксидативного і нітрозуючого стресу в головному мозку після гострої алкогольної інтоксикації надавало також і введення такого похідного L-лізину, як N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид. Так, введення цього похідного тваринам після гострої алкогольної інтоксикації призводило до достовірного зниження АФГ на 26%, КФГ на 30%, а нітротирозину – на 42% в порівнянні з контрольною групою тварин [260].

Подібну дію N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду в умовах гострого отруєння етанолом потрібно розглядати через призму його інгібуючого впливу на активність індукцибельної NOS і ролі цього ферменту в

ініціюванні нітрузуючого стресу. Індуцибельна NOS в даний час розглядається як перспективна мішень фармакокорекції при ряді нейродегенеративних захворювань, що експериментально підтверджується нейропротективною дією при введенні селективних інгібіторів цього ферменту [229, 314]. Введення тваринам з гострою алкогольною інтоксикацією L-лізину есцинату призводило до достовірного зниження маркерів окисної нейродеструкції – АФГ на 19%, КФГ на 21% і ніротирозину на 31% в головному мозку [39, 93, 113]. L-лізину гідрохлорид в умовах гострої алкогольної інтоксикації не проявляв достовірного впливу на рівень маркерів оксидативного стресу, але достовірно знижував маркер нітрузуючого стресу - ніротирозину на 26% і за ефективністю дії подібний до Мілдронату [253]. Введення Мілдронату призводило до достовірного зниження ніротирозину в головному мозку на 28% по відношенню до контролю, при цьому не впливаючи на маркери оксидативного стресу – АФГ і КФГ. Таким чином, всі досліджувані похідні L-лізину проявляють, різного ступеня вираженості і з різним латентним періодом, нейропротективну дію в умовах гострої алкогольної інтоксикації. Захисна дія на головний мозок у похідних L-лізину направлена на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій (тварини швидше реагували на звукові та тактильні подразники, переверталися на живіт, починали самостійно пересуватися), а також на зниження оксидативної нейродеструкції [244]. За силою нейропротективної дії два похідних L-лізину, а саме – Ангіолін і N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид достовірно перевершують ефективність Мілдронату, а два похідних – L-лізину есцинат і L-лізину гідрохлорид – можна порівняти з ним [24, 115, 316].

Таким чином, найбільш активним серед всіх досліджуваних похідних L-лізину є Ангіолін, який проявляє найбільш виражену за дією і найбільш ранню за часом реєстрації достовірну нейропротективну дію.

Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для більш поглибленого вивчення нейропротективної дії Ангіолну і його лікарських форм при хронічній алкогольній інтоксикації.

3.2. Дослідження нейропротективної дії найбільш перспективної сполуки, похідної L-лизину – (S)-2,6 діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетата (Ангіоліну) на моделі гострої алкогольної інтоксикації при профілактичному й лікувальному режимі введення

Спираючись на отримані результати проведених нами вищевказаних досліджень, ми поставили перед собою за мету провести дослідження з вивчення нейропротективної дії у потенційного препарату «Ангіолін» на моделі гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ) за такими показниками, як попередження когнітивно-мнестичних порушень, а також щодо зниження загибелі нейронів гіпокампу та зменшення нейроапоптозу [208, 209].

Після всіх проведених нами досліджень було встановлено, що гостра інтоксикація етанолом викликала порушення зареєстрованих у відкритому полі більш складних форм поведінки: дослідницької активності, просторової орієнтації і рівня мотивації. У щурів, які перенесли гостре важке отруєння етанолом, характер динаміки зміни рухової активності не відповідав критеріям «неасоціативного навчання», що говорить про спотворення під впливом етанолу природних процесів збереження і згасання навички. Оцінка стану поведінки і рухової активності щурів з використанням методу «відкрите поле» дозволила встановити зниження рухової активності щурів за рахунок зменшення горизонтальних і вертикальних переміщень на 3 добу після отруєння.

Результати досліджень представлені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Орієнтовно-дослідницька активність тварин (протягом 5 хв.) після гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ) на 3 добу експерименту

Групи тварин	Кількість горизонтальних рухів	Кількість вертикальних рухів	Грумінг (акти)	Дослідження отворів	Дефекація
Інтакт (n=10)	65±4,1	23,2±3,2	3,6±0,41	11,2±0,8	0,4±0,11
Контроль ГАІ (n=10)	10,7±1,6	3,81±0,41	0,7±0,08	1,22±0,2	0,57±0,08
ГАІ + Ангіолін, 50мг/кг, профілактичний режим (n=10)	37,1±4,4* ¹ (+247%)	10,7±1,3* (+181%)	3,5±0,14* (+400%)	4,22±0,52* ¹ (+246%)	0,3±0,1* (-47%)
ГАІ + Мілдронат, 100мг/кг, профілактичний режим (n=10)	14,7±3,8 (+37%)	5,21±1,0 (+37%)	1,5±0,11* (+114%)	1,7±0,61 (+39%)	0,6±0,1 (+5%)
ГАІ + Ангіолін, 50 мг/кг, лікувальний режим (n=10)	28,7±4,2* (+168%)	7,23±0,91* (+90%)	2,1±0,17* (+200%)	2,65±0,32* (+117%)	0,3±0,1* (-47%)
ГАІ + Мілдронат, 100мг/кг, лікувальний режим (n=10)	11,4±2,8 (+7%)	3,32±0,82 (-13%)	1,1±0,45 (+57%)	1,5±0,41 (+23%)	0,6±0,2 (+5%)

Примітка: * – $P < 0,001$ по відношенню до контрольної групи;

¹ – $P < 0,005$ по відношенню до групи, що одержувала Мілдронат у відповідному режимі введення.

Одноразове профілактичне введення Ангіоліну на 3 добу збільшувало горизонтальну рухову активність в 3,47 рази, вертикальну – в 2,81 рази і в 3,46 рази – дослідницьку активність в порівнянні з групою контролю. Також профілактичне введення Ангіоліну знижувало в 5 раз посталкогольну тривожність тварин. Одноразове введення Ангіоліну в лікувальному режимі збільшувало горизонтальну рухову активність в 2,68 рази, вертикальну – в 1,9 рази і в 2,17 рази – дослідницьку активність в порівнянні з групою

контролю. Також лікувальне введення Ангіоліну знижувало в 3 рази посталкогольну тривожність тварин. Порівняння показників орієнтовно-дослідницької активності в групах тварин, які отримували як в профілактичному, так і в лікувальному режимах введення Мілдронат з аналогічними показниками інтактної групи не виявив достовірних відмінностей. Таким чином, одноразове введення Ангіоліну в лікувальному і, особливо, в профілактичному режимі нівелювало порушення складних форм поведінки після важкого гострого отруєння етанолом, а саме: просторової орієнтації, дослідницької активності і рівня мотивації. У щурів, які перенесли гостре важке отруєння етанолом на фоні превентивного або подальшого введення Ангіоліну, характер орієнтовно-рухової активності відповідав критеріям «неасоціативне навчання», що свідчить про високу нейропротективну і ноотропну дію препарату, направлену, в тому числі, на відновлення природних процесів збереження і згасання навиків. Таким чином, встановлено, що розчин «Ангіолін» в лікувальному і, особливо, профілактичному режимі знижує ступінь неврологічних порушень при гострій алкогольній інтоксикації.

Важка гостра інтоксикація етанолом проявляла негативний вплив на нейрони гіпокампу. Так, вплив етилового спирту в субтоксичній дозі на нейрони СА-1 зони гіпокампу яскраво проявився в контрольній групі, яка отримувала тільки етанол [60]. Щільність нейронів в цій групі знизилася на 3 добу після важкої гострої алкоголізації до 901 нейрон/мм², в той час як в інтактній групі це показник склав 1447,2 нейрон/мм². На 3 добу після гострої алкогольної інтоксикації і на фоні профілактичного введення Мілдронату щільність нейронів склала на 6% більше по відношенню до контролю, а після профілактичного введення Ангіоліну – на 55% більше в порівнянні з контролем.

Результати досліджень представлені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Морфо-функціональні показники нейронів СА-1 гіпокампу щурів після гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ) на 3 добу експерименту

Групи тварин	Щільність нейронів (нейрон/мм ²)	Площа нейронів (мкм ²)	Вміст РНК (E _{оп})
Інтакт (n=10)	1447,2±127,1	168,2±12,2	15,3±0,81
Контроль ГАІ (n=10)	901±70,1	143,0±8,1	11±0,8
ГАІ + Ангіолін, 50 мг/кг, лікувальний режим (n=10)	1108,7±52,2* ¹	150±9,7* ¹	14,7±0,77* ¹
ГАІ + Ангіолін, 50мг/кг, профілактичний режим (n=10)	1401,2±97,5* ¹	162,7±11,1* ¹	14,1±0,7* ¹
ГАІ + Мілдронат, 100мг/кг, лікувальний режим (n=10)	917±62,1*	144,0±11,1	12±10,1
ГАІ + Мілдронат, 100мг/кг, профілактичний режим (n=10)	953±50,7*	145,0±9,1	12±0,7

Примітка: * – $P \leq 0,05$ по відношенню до контрольної групи;

¹ – $P \leq 0,05$ по відношенню до групи, що одержувала Мілдронат у відповідному режимі введення.

Подібні зміни відмічалися і щодо показника площі нейронів - в контрольній групі він знизився до 143 мкм² в порівнянні з 168,2 мкм² групи інтакту. Проведена експериментальна терапія впливала на цей показник. Так, профілактичне і лікувальне введення Мілдронату не робило на цей показник достовірного впливу, в той же час профілактичне введення Ангіоліну підвищувало цей показник на 14%, а введення в лікувальному режимі – на 5%. Також підвищився вміст РНК у порівнянні з групою контролю в

нейронах гіпокампу тварин, які отримували Ангіолін профілактично на 28% і на 33% – при лікувальному шляху введення препарату. Мілдронат при тих шляхах введення, які досліджувалися, не впливав на рівень РНК після гострої алкогольної інтоксикації. Виявлені зміни, на нашу думку, відображають характер пошкодження нейронів в умовах важкої гострої алкогольної інтоксикації, яка полягала в значному зменшенні структурних і пластичних компонентів клітин. Курсове призначення Ангіоліну демонструвало більш виражену нейропротективну дію, ніж Мілдронат, яка характеризувалося відновленням щільності та площі тіл нейронів у порівнянні з інтактною групою тварин, а також значним відновленням вмісту РНК в клітинах. Таким чином, за результатами морфо-гістохімічного аналізу нейронів СА-1 зони гіпокампу Ангіолін продемонстрував виражені позитивні ефекти на репаративні процеси в нейроцитах, забезпечуючи тим самим нейропротекцію в умовах гострої алкогольної інтоксикації [229].

Накопичення в нейрональній клітині продуктів окисної модифікації ліпідів, білків, нуклеїнових кислот в умовах важкої гострої алкогольної інтоксикації, як вже було відмічено вище, може призводити до токсичної і апоптичної загибелі певної популяції нервових клітин [223, 313]. Аналіз щільності деструктивно змінених і апоптичних нейронів в СА-1 зоні гіпокампу показав, що хронічна алкогольна інтоксикація супроводжувалася збільшенням щільності пошкоджених клітин на 93% по відношенню до інтакту (табл.3.5).

Таблиця 3.5

Показники апоптозу нейронів СА-1 гіпокампу щурів після гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ) на 3 добу експерименту

Групи тварин	Щільність апоптичних і деструктивних клітин на 1 мм ²	Доля апоптичних клітин, %
1	2	3
Інтакт (n=10)	73,3±5,3	3,8±0,5

Продовження таблиці 3.5

1	2	3
Контроль ГАІ (n=10)	141,2±8,0	15,2±0,82
ГАІ + Ангіолін, 50 мг/кг, лікувальний режим (n=10)	87,2±7,1* ¹	5,1±0,22* ¹
ГАІ + Ангіолін, 50мг/кг, профілактичний режим (n=10)	77,8±5,2* ¹	3,8±0,4* ¹
ГАІ +Мілдронат, 100мг/кг, лікувальний режим (n=10)	123,2±8,1*	14,4±0,6
ГАІ + Мілдронат, 100мг/кг, профілактичний режим (n=10)	118,0±6,0*	10,2±0,6*

Примітка: * – $P \leq 0,05$ по відношенню до контрольної групи;

¹ – $P \leq 0,05$ по відношенню до групи, що одержувала Мілдронат у відповідному режимі введення.

Профілактичне введення препарату Мілдронат призводило до зниження щільності апоптично і деструктивно змінених нейроцитів на 16%. Лікувальне введення Мілдронату знижувало цей показник на 13%. Профілактична терапія Ангіоліном привела до значного зниження кількості апоптичних і деструктивно змінених нейронів – на 45% менше, ніж у контрольної групи. Лікувальне введення Ангіоліну знижувало цей показник на 38%. Профілактична та лікувальна терапія Ангіоліном і Мілдронатом приводила до достовірного зниження частки апоптотичних клітин. Найбільш ефективним в цьому відношенні було введення Ангіоліну в профілактичному режимі введення.

Отже, у щурів, які перенесли гостре важке отруєння етанолом, на фоні превентивного або подальшого введення Ангіоліну характер орієнтовно-

рухової активності відповідав критеріям «неасоціативне навчання», що свідчить про високу нейропротективну і ноотропну дію препарату, направлену, в тому числі, на відновлення природних процесів збереження і згасання навички. Внутрішньочеревне ведення Ангіоліну (50 мг/кг) в лікувальному і, особливо, в профілактичному режимі щурам, які перенесли важке отруєння етанолом, призводило до достовірного підвищення щільності нейронів СА-1 зони гіпокампу, збільшення вмісту в них РНК і зниження кількості нейронів з ознаками апоптозу [26, 60].

За силою нейропротективної дії Ангіолін при профілактичному і лікувальному режимі введення тваринам, які перенесли гостре важке отруєння етанолом, достовірно перевершував дію Мілдронату (100 мг/кг), що вводився в аналогічних режимах.

Таким чином, узагальнення накопичених відомостей про позитивний вплив Ангіоліну як нейропротектора при гострій та хронічній алкогольних інтоксикаціях, визиває особливу увагу до даного препарату і стимулює до подальшого поглибленого його дослідження [40, 234].

3.3. Визначення ефективної терапевтичної дози таблеток «Ангіолін» на моделі гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ)

Всі дози таблеткової маси «Ангіоліну», що вводилися, проявляли захисну дію на головний мозок щурів в умовах гострої алкогольної інтоксикації. «Ангіолін» в діапазоні доз 25-250 мг/кг різного ступеня вираженості знижував вміст маркера нітрозуючого стресу - нітротирозину, підвищував активність глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи (підвищення активності ГПР і збільшення вмісту відновленого глутатіону) у головному мозку експериментальних тварин [34, 36, 87, 125, 292].

Результати досліджень представлені в таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

Показники систем NO і глутатіону головного мозку щурів в залежності від доз таблеток «Ангіолін», що вводяться в умовах гострої алкогольної інтоксикації (ГАІ)

Група тварин	Нітротирозин, нмоль/г тканини	Відновлений глутатіон, мкМ/г тканини	ГПР, мкМ/мг/хв
Інтакт	17,4±1,5	3,8±0,12	67,5±5,3
Контроль (ГАІ)	137,7±12,3	2,3±0,14	42,7±3,3
Ангіолін, 25 мг/кг	125,4±11,3 (-8%)	2,6±0,17 (+13%)	47,8±4,3 (+11%)
Ангіолін, 50 мг/кг	87,6±6,3* (-36%)	3,3±0,12* (+43%)	66,2±5,0* (+55%)
Ангіолін, 100 мг/кг	64,5±6,2* (-53%)	3,8±0,11* (+65%)	71,1±5,2* (+66%)
Ангіолін, 150 мг/кг	65,1±4,1* (-52%)	3,8±0,10* (+65%)	68,7±4,3* (+60%)
Ангіолін, 200 мг/кг	67,5±3,6* (-50%)	3,6±0,12* (+56%)	66,8±5,1* (+56%)
Ангіолін, 250 мг/кг	70,3±4,1* (-48%)	3,6±0,15* (+56%)	65,5±4,0* (+53%)

Примітка: * – P < 0,05 по відношенню до контрольної групи.

Діаграма розсіювання Нітротирозин, нмоль/г білка

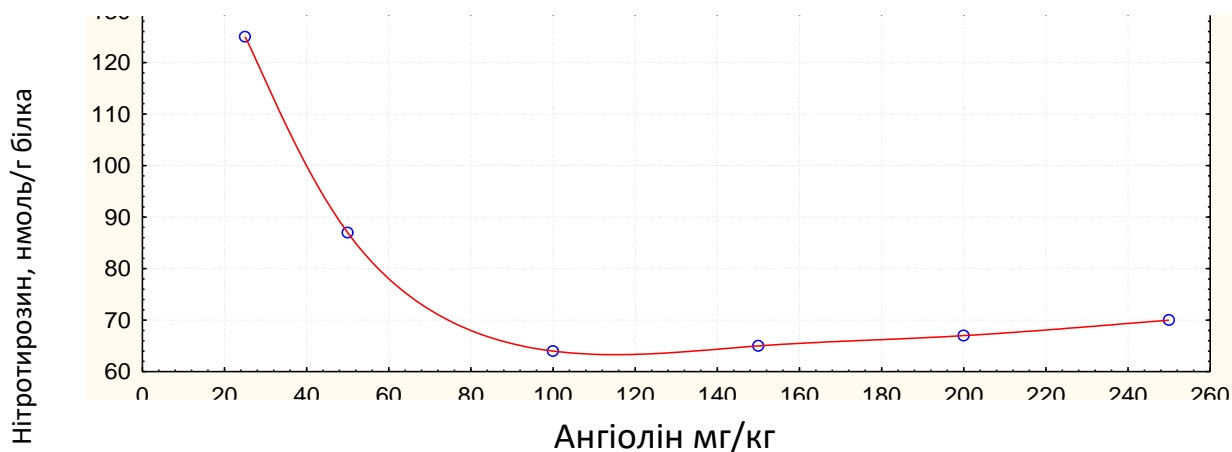


Рис. 3.1 І рафік залежності «Доза Ангіоліну - зниження рівня нітротирозину»

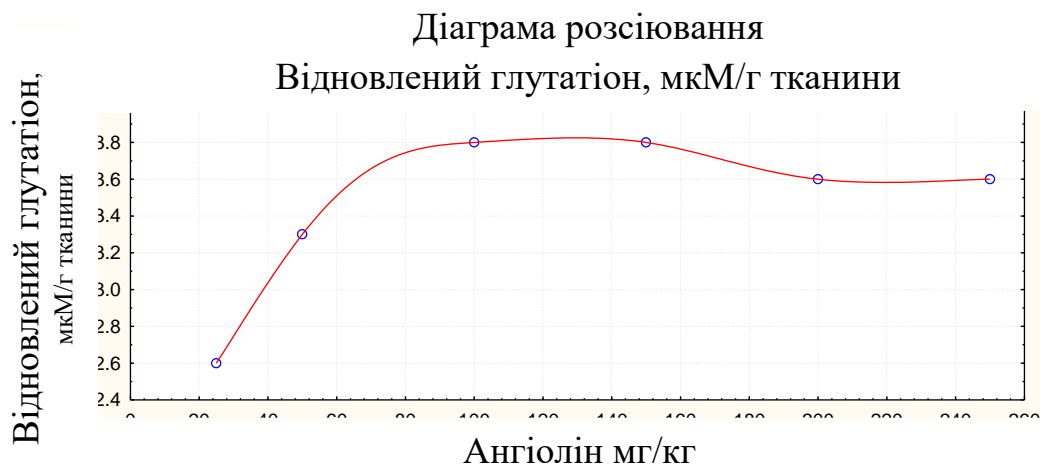


Рис.3.2 Графік залежності «Доза Ангіоліну - підвищення рівня відновленого глутатіону»

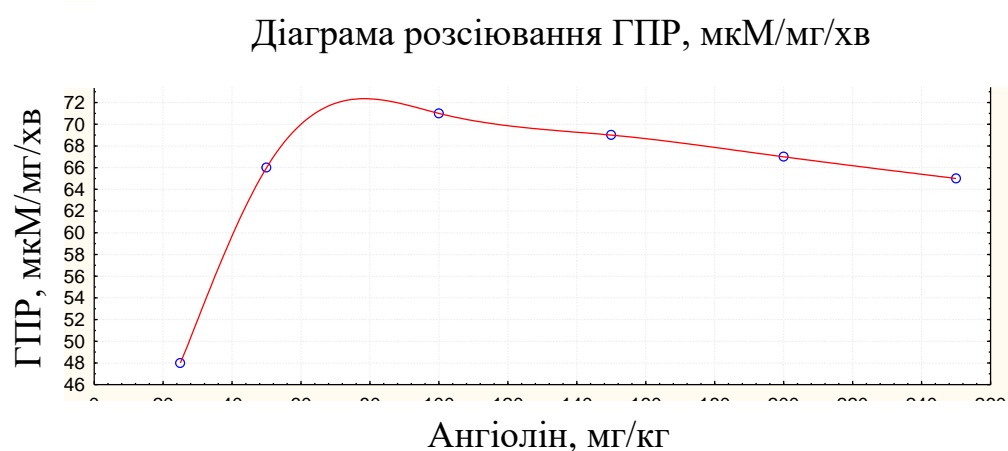


Рис.3.3 Графік залежності «Доза Ангіоліну - підвищення активності ГПР»

Графік поверхні

Ангіолін, мГ/кг = Відстань зважених найменших квадратів

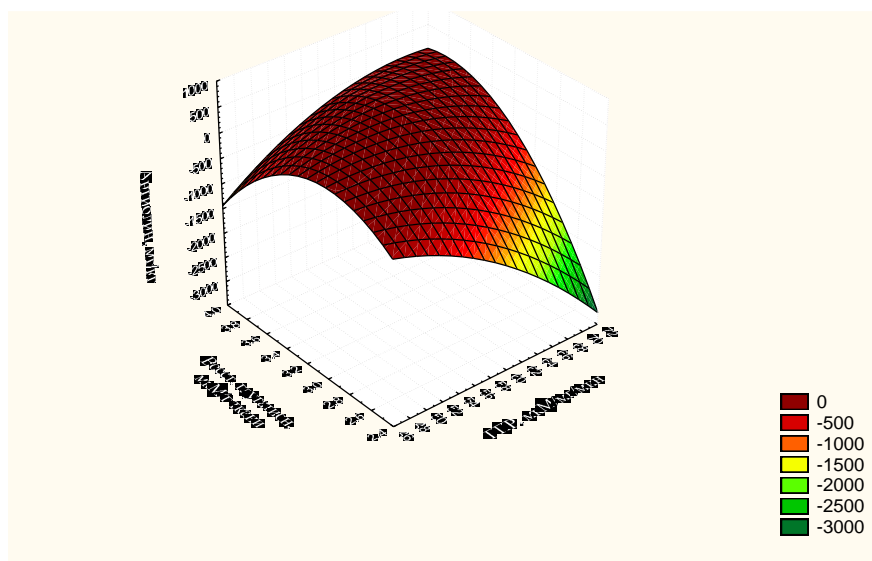


Рис. 3.4 Тривимірний графік залежності доза Ангіоліну - підвищення рівня відновленого глутатіону – зниження рівня нітритозину - підвищення активності ГПР в головному мозку щурів з алкогольною інтоксикацією [56, 88, 295].

Типова крива: **доза-ефект** для групи тварин – симетрична щодо середньої точки (50% відповідь). Основні значення відповіді групи на препарат зосереджені навколо середнього значення.

Центральна точка кривої (значення 50% відповіді) – середня ефективна доза (ED_{50}) – 100 мг/кг. Ця величина є найбільш точною кількісною характеристикою терапевтичної ефективності, оскільки значення 95% довірчого інтервалу тут мінімальні. Чутливість більшості тварин в популяції близька середнього значення. Інтервал доз, що включає основну частину кривої навколо центральної точки, іноді позначається як "потенція" препарату. Невелика частина популяції в лівій частині кривої "доза-ефект" реагує на малі дози препарату. Це група надчутливих або гіперреактивних осіб. Інша частина популяції в правій частині кривої реагує лише на дуже великі дози препарату. Це малочутливі, гіпореактивні або резистентні щури. Нахил кривої "доза-ефект", особливо поблизу середнього значення, характеризує розкид доз, що викликають ефект. Ця величина показує, наскільки великою буде зміна реакції популяції на дію препарату зі зміною діючої дози. Крутий нахил вказує на те, що більша частина популяції буде реагувати на препарат приблизно однаково у вузькому діапазоні доз, в той час як пологий нахил свідчить про суттєві відмінності в чутливості тварин до препарату. Форма кривої і її екстремальні точки залежать від цілого ряду зовнішніх і внутрішніх факторів, таких як стан механізмів репарації ушкоджень, оборотність викликаних ефектів і т.д. Так, токсичний процес може не розвиватися доти, поки не вичерпаються механізми захисту організму від діючого препарату, не наступить насичення процесів біохімічної детоксикації. Так само насичення процесів утворення токсичних метаболітів з вихідного ксенобіотика може стати причиною виходу кривої "доза-ефект" на плато (рис. 3.1-3.4).

Таким чином, сполуки Ангіоліну при інтрагастральному введенні щурам з гострою алкогольною інтоксикацією мають виражену

нейропротективну дію в інтервалі доз 50-150 мг/кг, при цьому ЕД₅₀ становить 100 мг/кг.

3.4. Вивчення гострої токсичності сполуки Ангіолін при інтрагастральному введенні

Результати представлені в таблиці 3.7 і свідчать про те, що одноразове внутрішньошлункове введення Ангіоліну в дозі 11000 мг/кг не викликало загибелі жодної тварини. При введенні Ангіоліну в дозі 13000 мг/кг загинув 1 щур в період між 1 і 2 добою, а 5 залишалися живими. Від дози 15000 мг/кг протягом 36 годин загинуло 3 тварин з 6. Введення сполуки Ангіоліну в дозі 17000 мг/кг викликало загибель 5 тварини в нічний час за 1 добу спостереження. Одноразове внутрішньошлункове введення Ангіоліну в дозі 19000 мг/кг викликало 100% загибель тварин протягом доби.

Таблиця 3.7

Результати дослідження з визначення гострої токсичності Ангіоліну при одноразовому внутрішньошлунковому введенні білим нелінійним щурам через 2 тижні спостереження

Доза, мг/кг (№ групи)	11000 (1)	13000 (2)	15000 (3)	17000 (4)	19000 (5)
Вижило	6	5	3	1	0
Померло	0	1	3	5	6

24000

$$LD_{50} = 19000 - \frac{24000}{6} = 15000 \pm 211 \text{ мг/кг}$$

6

Спостереження за тваринами, які отримували проміжні дози Ангіоліну, дозволили нам визначити ЛД₅₀ при внутрішньошлунковому введенні, яка становить 15000 ± 211 мг / кг.

Картина гострого отруєння тварин, які отримали токсичну дозу Ангіоліну при внутрішньошлунковому і внутрішньочеревному шляхах введення, характеризувалася млявістю, загальмованістю, пасивністю, полідипсією у всіх щурів. Через кілька хвилин симптоми посилюються, дихання по Чейн-Стоксу, гіподинамія. Через 2 години дихання стає ледве помітним, слабким, відсутні будь-які рухи. Загибель тварин відбувалася від паралічу дихального центру. У тварин, які отримали проміжні дози Ангіоліну, що вижили до 14 діб, протягом 12 годин спостерігалася млявість, загальмованість, пасивність, полідипсія. Дихання чейн-стоксовського типу, внаслідок порушення кровопостачання і зниження збудливості дихального центру. Через 24 години симптоми поступово почали слабшати, аж до повного зникнення. Через 48-72 години після введення препарату щурам, дихання нормалізувалося, відновилися рухова активність, з'явився здоровий апетит. Нашими дослідженнями показано зміни маси тіла щурів, які вижили, котрим одноразово внутрішньошлунково вводили Ангіолін в дозах від 11000 до 17000 мг/кг (табл. 3.8).

Таблиця 3.8.

Динаміка зміни маси тіла щурів, що вижили після одноразового внутрішньошлункового введення Ангіоліну (11000-17000 мг/кг) ($M \pm m$)

Період спостережень	Початкова вага, г	Вага на 7-у добу, г	Вага на 14-у добу, г
Інтактні тварини (n=6)	162,7 ± 2,1	170,0 ± 4,1	175,3 ± 3,2
Тварини, що отримали Ангіолін одноразово (n=20)	166,2 ± 7,0	174,1 ± 6,0	177,8 ± 4,7

При анатомічному розтині загиблих щурів усіх груп, яким внутрішньошлунково вводили Ангіолін, спостерігалася виражене

повнокров'я судин черевини, печінка повнокровна, світло-коричневого кольору, м'якої консистенції, краї печінки закруглені. Слизова шлунка гіперемована, набрякла. При розгляданні в розрізі тканина має блискучу поверхню. Портальні тракти набряклі, повнокров'я центральних міждолькових вен. Головний мозок – без видимих змін, дрібні крововиливи, судини мозочка і стовбура розширені, повнокровні. Тимус помірно в'ялий, блідо-рожевий. Шлунок, при внутрішньошлунковому введенні препарату, повний, сечовий міхур повний. Тонка кишка заповнена вмістом, висхідна ободова кишка роздута. Сечовий міхур повний. Нирки без видимих зовнішніх змін. Судини мозочка і стовбура сильно розширені, повнокровні. Тимус помірно в'ялий, блідо-рожевий. В серці у загиблих тварин шлуночки щільні в стадії скорочення, кровоносні судини повнокровні. У серці виявлено помірне розширення і повнокров'я судин артеріального і венозного русла, в навколосерцевім просторі невелике скупчення крові.

За результатами дослідження гострої токсичності сполуки Ангіолін на щурах, його можна віднесли до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини).

Результати проведених дослідів дозволяють зробити наступні висновки:

1. Всі похідні L-лізину, які досліджувалися, проявляють виражену в різному ступені і з різним латентним періодом, нейропротективну дію при внутрішньочеревному введенні ((S)-2,6діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тиоацетат (Ангіолін), 50 мг/кг, L-лізину гідрохлорид, 100 мг/кг, L-лізину есцинат, 0,5 мл/кг, L - NIL (N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид), 20 мг/кг) після моделювання гострої алкогольної інтоксикації. У похідних L-лізину захисна дія на головний мозок спрямована на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій (тварини швидше реагували на звукові подразники, взяття їх в руки, переверталися на живіт, починали самотійно пересуватися), а також на

зниження оксидативної нейродеструкції [93, 127, 265].

2. В результаті порівнянь, два похідних L-лізину, а саме L-лізину есцинат і L-лізину гідрохлорид, за силою проявленої нейропротективної дії проявляють таку ж ефективність, що і Мілдронат. Два похідних L-лізину - Ангіолін і N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид проявили себе більш ефективними за референс-препарат [272].

3. Найбільш активним серед досліджуваних похідних L-лізину є Ангіолін, який має найбільш виражену і найбільш ранню за часом реєстрації достовірну нейропротективну дію. Внутрішньочеревне ведення Ангіоліну в лікувальному і, особливо, в профілактичному режимі щурам, які перенесли важке отруєння етанолом, призводило до достовірного підвищення щільності нейронів СА1-зони гіпокампу (на 13-16 %%), збільшення вмісту в них РНК (28-33 %) і зниження кількості нейронів з ознаками апоптозу (38-45 %%). У щурів, які перенесли гостре важке отруєння етанолом на фоні превентивного або подальшого введення Ангіоліну, характер орієнтовно-рухової активності відповідав критеріям «неасоціативне навчання» (збільшення горизонтальної активності в 2,68-3,47 рази, вертикальної активності – в 1,9-2,8 рази, дослідницької активності в 2,17-3,46 рази, а також зниження тривожності в 3-5 разів). За силою нейропротективної дії Ангіолін, при профілактичному і лікувальному режимі введення тваринам, які перенесли гостре важке отруєння етанолом, достовірно перевершував дію Мілдронату (100 мг/кг).

4. Встановлено, що ЕД₅₀ Ангіоліну при внутрішньошлунковому введенні щурам з гострою алкогольною інтоксикацією становить 100 мг/кг, а ЛД₅₀ при аналогічному введенні щурам складає 15000 ± 211 мг/кг.

5. Отримані результати експериментально обґрунтовують перспективність подальших досліджень нейропротективних властивостей Ангіоліну при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації у вигляді таблеток.

Розділ 4. Нейропротективна і ендотеліопротективна дія таблеток «Ангіолін» при хронічній алкогольній інтоксикації під час лікувального і профілактичного режиму введення

4.1. Вплив Ангіоліну на неврологічні і когнітивні порушення у експериментальних тварин при хронічній алкогольній інтоксикації під час лікувального режиму введення

В експерименті було встановлено, що вживання етанолу супроводжується ознаками неврологічних порушень: ригідність хвоста, гіперемія шкірних покривів, хаотичні рухи тварин в клітці, які змінюються млявістю, пасивністю щурів, зменшенням рухової активності, тривалим перебуванням тварин на боці, нездатністю триматися на стержні, що обертається, протягом 3 хвилин.

Проведена оцінка неврологічного статусу відповідно до шкали stroke-index за McGrow показала негативну динаміку з початку хронічної алкоголізації і до початку лікування у вигляді тремору, тривожності, конфліктності, агресивності, гіперактивності, в подальшому млявості і дискоординації рухів, апатії, пасивного перебування тварин в лежачому стані, тонічних і конічних судом, птозу. З 2 доби у всіх щурів, що вживали етанол, зафіксовано 1-2 бали за McGrow, поступово спостерігалось наростання балів від 1-2 до 4-5 протягом 14 днів насильницької алкоголізації, з 14 по 21 добу відзначено 4-6 балів, з 21 по 30 добу - зафіксований максимум 6-7 балів [287]. Необхідно відзначити, що в контрольній групі відміна етанолу не приводила до регресу неврологічного дефіциту протягом наступних 14 днів. З початком лікування відзначалася позитивна динаміка з регресом неврологічної симптоматики в групах тварин, які отримували Ангіолін і Мілдронат. Серед досліджуваних препаратів найбільш активним виявився Ангіолін, що зменшував прояви неврологічної симптоматики з перших 3 днів лікування [200]. На тлі прийому Ангіоліну у тварин значно

зменшилися прояви неврологічних порушень: тремор, ригідність хвоста, хаотичні рухи в клітці, птоз, гіперактивність, судомні скорочення м'язів з перших днів прийому на відміну від інших препаратів. Ангіолін проявив значний седативний вплив на тварин в порівнянні з групою референс-препарату (зниження проявів гіперактивності, агресивності (табл.4.1)).

Таблиця 4.1

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на неврологічні порушення у тварин з 30-денною хронічною алкоголізацією і 14-денним подальшим лікуванням (шкала С.Р. McGrow, бали)

Групи тварин (по 10 щурів кожна група)	1 доба	7 доба	14 доба	21 доба	30 доба	37-е доба	44-е доба
Інтакт (n=10)	0	0	0	0	0	0	0
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	0	3,4± 0,47	3,4± 0,47	5,71± 0,5	5,75± 0,5	4,35± 0,65	3,10± 0,22
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	0	3,95± 0,39	4,25± 0,49	5,7± 0,48	5,85± 0,44	3,15± 0,30*	1,85± 0,13*
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	0	4,6± 0,3	4,6±0, 3	5,65± 0,47	5,81± 0,42	1,7± 0,1* ¹	0,1± 0,1* ¹

Примітка: *– $p \leq 0,05$ відносно контролю;

1– $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату

Мілдронат показав регрес неврологічної симптоматики протягом 7 днів на 1-2 балів по McGrow. З 7 по 14 день лікування неврологічна симптоматика практично повністю регресувала в групі тварин, які отримували Ангіолін.

У тварин також пригнічувалася орієнтовно-пошукова активність, спостерігався розвиток когнітивного дефіциту (достовірно, починаючи з 3 доби, і зберігався протягом усього періоду алкоголізації) [15]. Так, у тварин, які вживали етанол протягом 30-ти днів, знижувалася кількість

горизонтальних і вертикальних переміщень, кількість заглядань в отвори. Треба відзначити, що подібні порушення в поведінці зберігалися і протягом 14 днів після відміни прийому алкоголю.

В результаті проведеного лікування у тварин з алкоголізмом спостерігалось поліпшення орієнтовно-пошукової активності, що виражалось у збільшенні числа горизонтальних і вертикальних рухів, грумінга і дослідження отворів (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на орієнтовно-дослідницьку активність тварин (протягом 5 хв.) з 30-денним хронічним алкоголізмом і 14-денним подальшим лікуванням

Групи тварин	Кількість горизонтальних рухів	Кількість вертикальних рухів	Грум-мінг (акти)	Дослідження отворів	Дефекація
Інтакт (n=10)	64±3,5	21,1±2,7	3,3±0,55	10,2±0,7	2,00±0,56
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	12,11±2,7	5,75±1,02	1,1±0,38	2,70±0,77	0,90±0,30
Мілдронат, 250 мг/кг(n=10)	24,2±5,8* (+99%)	10,3±1,8* (+78%)	1,6±0,50 (+45%)	3,5±0,5 (+31%)	1,1±0,7 (+22%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	51,1±5,7* ¹ (+321%)	18±2,2* (+211%)	1,5±0,50 (+40%)	6,7±0,7* ¹ (+151%)	1,5±0,5 (+66%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Введення Ангіоліну показало на 14-й день лікування збільшення кількості горизонтальних рухів (в 4 рази), вертикальної активності і

дослідження отворів (в 2 й 1,5 рази), грумінга (на 40%), кількості дефекацій (на 66%) в порівнянні з групою тварин, що не підлягали лікуванню після 30-добової алкоголізації. Мілдронат, який вводився за тою ж схемою, показав менш значні результати. Після 30-денної алкоголізації у щурів спостерігалось зменшення латентного періоду заходу в темний відсік, що характеризує пригнічення процесів навчання і пам'яті (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на збереження умовної реакції пасивного уникнення у щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Групи тварин (по 10 щурів кожна група)	Латентний період у тесті УРПУ до навчання, сек	Латентний період в тесті УРПУ через 24 години після навчання, сек	Кількість тварин, що навчалися, %
Інтакт (n=10)	9,88±1,08	172,2±2,76	100
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	7,11±0,35	36,11±3,04	30
Мілдронат, 250 мг/кг(n=10)	6,1±0,406 (-14%)	38,3±8,48 (+6%)	30
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	4,7±0,63*, (-33%)	84,7±4,24*, ¹ (+134%)	80

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Після проведеного лікування в групі тварин, які отримували Ангіолін, відзначається значне збільшення латентного періоду заходу в темний відсік (достовірно по відношенню до контролю), який майже наблизився до інтакту.

Мілдронат не показував збільшення латентного періоду заходу в темний відсік. Ми отримали результати досліджень, які переконливо показують значну нейропротективну активність Ангіоліну в порівнянні з Мілдронатом в умовах сформованого алкоголізму. Нейропротективна дія Ангіоліну реалізовувалася зменшенням неврологічних порушень і нормалізацією когнітивних функцій.

4.1.2. Вплив Ангіоліну на показники оксидативного і нітрозативного стресу в головному мозку при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації під час лікувального режиму введення

На фоні хронічної алкогольної інтоксикації у щурів розвився оксидативний і нітрозативний стрес, про що свідчило підвищення показників альдегідфенілгідразонів (АФГ) і кетонфенілгідразонів (КФГ), а також продуктів нітрозолування білків – нітротирозину в головному мозку і плазмі крові. Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи не тільки первинну, але і вторинну, і третинну структуру білків, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули. Багато ферментів, що містять SH-групи, такі як АТФ-ази або дегідрогенази, легко окислюються в результаті вільнорадикальної атаки [32]. Так, в групі контролю показники АФГ і КФГ підвищилися на 54,35% і 71,43% відповідно в порівнянні з групою інтакту, також показники нітротирозину в плазмі крові і головному мозку щурів підвищилися на 212,74% і 737,32% відповідно в порівнянні з групою інтакту (табл. 3.4).

Оксидативний стрес призводить до пошкодження найбільш важливих полімерів – нуклеїнових кислот, білків і ліпідів, АФК викликають пошкодження ДНК (окислення основ, їх модифікація, розриви ланцюгів, пошкодження хромосом). В результаті знижується або зникає їх різноманітна функціональна активність (ферментативна, регуляторна, участь в матричних синтезах, транспорт іонів і ліпідів), і як результат усього цього – зміна нормального функціонування нейронального апарату головного мозку,

порушення пам'яті і когнітивно-мнестичних функцій [15]. В умовах оксидативного стресу АФК атакують макромолекули клітинної мембрани нейрону, що призводить до їх окислювальної модифікації і деструкції. Мембрани клітин, зокрема нейронів, характеризуються високим вмістом арахідонової, декозагесаєнової і інших жирних поліненасичених кислот, легко окислюються під дією АФК, особливо супероксидрадикалу і гідроксилрадикалу [20]. Окислення жирних кислот мембран має ланцюговий характер і йде по вільно-радикальному механізму з проміжним утворенням нестабільних алоксильних і пероксильних радикалів і, в кінцевому підсумку, з утворенням стабільних продуктів: п-алкеналей, 2-алкеналей, 2,4-алкандієнів, алкантриєнів, α -гідроксіалкеналей, гідропероксіалкенів і малонового діальдегіду. Показано, що тривале вживання етанолу призводить до росту в тканинах мозку алкандієнів, триєнів і малонового діальдегіду. Пероксидні продукти окислення мембранних ліпідів порушують регулярну упаковку мембранного бішару і викликають утворення в мембрані дефектних зон. Алкеналі і гідроксиалкеналі, особливо продукт окислення ω -6 ПНЖК - 4-гідрокси-2,3-трансненаль, утворюють аддукти з фосфоліпідами, білками, нуклеїновими кислотами, призводячи до їх пошкодження [16].

Малоновий діальдегід, взаємодіючи з білками і нуклеїновими кислотами, крім того, викликає утворення міжмолекулярних зшивок, причому ця властивість посилюється при ацидозі. Подібна дія альдегідів і гідроксиалкеналей призводить до зміни структури рецепторів, іонних каналів, цитоскелету клітини, ферментів, пригнічення синтезу внутрішньоклітинних посередників і викликає деструкцію ДНК і РНК [33, 231]. Надлишок NO посилює експресію каспаз, які відносяться до сімейства $\text{IL-1}\beta$ -конвертуючих протеаз, причетних до розгалуження ланцюга апоптозу. Експресія каспаз-3 виявлена в нейронах і астроглії пацієнтів з хворобою Альцгеймера, а каспаз-1 в нейронах пацієнтів з черепно-мозковою травмою і каротидним інсультом [227]. Надлишок АФК, особливо $\text{OH}\cdot$ і $\text{ONOO}\cdot$, здатні піддавати окислювальній модифікації нуклеїнові кислоти, в результаті чого

відбувається пошкодження основ, пошкодження дезоксирибози і поява нових ковалентних зв'язків ("зшивок") [272]. Створений в результаті взаємодії $\text{OH} \bullet$ і ONOO^- пероксинітрит сприяє відкриттю гігантської пори мітохондрій, а також нітрузує цитохром С в мітохондріях, що призводить до зміни його функцій, зокрема він стає нездатним підтримувати перенесення електронів в дихальній ланцюзі і не відновлюється аскорбатом. Оскільки одночасно відбувається вихід цитохрому С (у тому числі і нітрованого) в цитоплазму, то можна припускати участь такого процесу нітрозолування і в якихось сигнальних процесах. Пероксинітрит нітрузує гуанін, що призводить до розриву ланцюжків ДНК і до мутацій або запуску процесів апоптозу [144].

Терапія Мілдронатом приводила до зниження рівня АФГ і КФГ на 17% і 15% відповідно по відношенню до контролю, а також до зниження ніротирозину плазми крові на 23,6% і в головному мозку на 39,20% по відношенню до контролю. Найбільш ефективний препарат - Ангіолін показав зниження АФГ і КФГ на 32,39 і 36,66% достовірно по відношенню до контролю, а також зниження ніротирозину плазми крові на 60% і головного мозку на 67,2% достовірно по відношенню до контролю. Антиоксидантні ефекти Ангіоліну включають в себе гальмування утворення АФК в глутамат-кальцієвому каскаді і в біоенергетичних системах мітохондрій, а також інактивація кисневих радикалів (табл. 4.4) [192, 337].

Таблиця 4.4

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на маркери оксидативного стресу в головному мозку в умовах моделювання 30-денної хронічної алкоголізації і подальшої 14-денної терапії

Група тварин	Продукти ОМБ, у.о./г білка		Ніротирозин плазми крові, нмоль/г білка	Ніротирозин головного мозку, нмоль/г тканини
	АФГ	КФГ		
1	2	3	4	5
Інтакт (n=10)	0,368±0,02	0,175±0,02	6,21±0,53	17,23±1,05

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	0,568±0,06	0,3±0,02	19,5±2,13	144,27±18,5
Мілдронат, 250 мг/кг(n=10)	0,472±0,03* (-16%)	0,255±0,015* (-15%)	14,85±1,17* (-23%)	87,71±6,4 (-39%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	0,384±0,03* ¹ (-32%)	0,19±0,02* ¹ (-36%)	7,73±0,51* ¹ (-60%)	47,26±2,63* ¹ (-67,2%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Ангіолін проявляв значний профілактичний вплив на запуск процесів окисної модифікації білкових молекул на фоні хронічної насильницької алкоголізації тварин, практично наближаючись до показників групи інтакту. Результатом цього є протекція нервових клітин від впливу токсичних дериватів деградації етанолу.

При пошкодженні нейронів головного мозку на фоні хронічної алкогольної інтоксикації важливу роль грають порушення в нітросидергічній системі головного мозку [20].

Відповідно до сучасних уявлень, нейродеструкція супроводжується розвитком складних патобіохімічних каскадів в нейроні – порушення енергетичного метаболізму, розвиток трансміттерного аутокоїдозу; формування стійкої мітохондріальної дисфункції супроводжується гіперпродукцією АФК і NO в «паразитарних» реакціях і експресією проапоптичних білків [61, 244]. Відомо, що запуск програми, що веде до смерті нейрона, може здійснюватися цитокінами, гормонами, АФК, дериватами NO, окисленими тіолами, продуктами окисної модифікації білків і нуклеїнових кислот [199]. При дії подібних факторів на клітину, в ній

запускається безліч сигнальних шляхів, що ведуть до нейтралізації наслідків їх негативного впливу або, в разі непоправного пошкодження, до елімінації клітини. Така елімінація пошкоджених клітин відбувається шляхом апоптозу або програмованої клітинної загибелі. У розвитку апоптотичного процесу бере участь безліч сигнальних молекул, багато з яких регулює і інші важливі функції організму. До найбільш вивчених факторів, здатних запускати в нейроні апоптотичну програму, відноситься оксид азоту (NO) – одна з ключових сигнальних молекул, що регулює функції серцево-судинної, нервової та імунної систем організму [34]. Унікальна хімічна природа і велика кількість внутрішньоклітинних цілей для NO і його фізіологічно активних окислювально-відновних форм, залишають відкритим питання, яким чином і наскільки специфічно опосередковується шкідлива дія оксиду азоту на нейрон в умовах ішемії [10, 140]. Багатьма роботами було показано безпосередню участь NO в процесі деструкції нейрона при ішемії при призначенні тваринам з патологією мозку селективних інгібіторів нейрональної та індукцибельної ізоформ NOS, а також в дослідях на тваринах з дефіцитом гена, що кодує iNOS. Отримано дані про зростання концентрації NO в мозку тварин як з ішемією мозку, так і на фоні хронічного споживання алкоголю [141]. Найбільше значення в захисті нейронів в умовах алкогольного пошкодження має СОД, яка містить тіольні групи (цистеїн, метионін і цистін), а також гістидиномісткі дипептиди (карнозин, анзерин, гомокарнозин) [87]. Нейрони з дефіцитом СОД менш стійкі до підвищених концентрацій глутамату, перекису водню і донорів NO [124]. Відомо, що NO в клітинах-мішенях утворює активні деривати, такі як нітрозоній (NO⁺), нітроксил (NO⁻) і пероксинітрит (ONOO⁻). Дослідженнями останніх років встановлено, що NO, і особливо, продукти його перетворення, такі, як пероксинітрит (ONOO⁻), іон нітрозонія (NO⁺), нітроксил (NO⁻) і діазоттриоксид (N₂O₃) є основними факторами реалізації нітрозуючого стресу, в результаті якого відбувається пряма взаємодія NO з металами (гемове залізо гемоглобіну, міоглобіну, залізовмісних ензимів, а також

негемове залізо заліzosірчаних білків і ДНК, мідь і цинкаактивних центрів-ферментів), а також непряма взаємодія NO + (S-, N-, O-нітрузування) з тіольними, фенольними, гідроксильними і аміногрупами білків і ДНК [33, 47]. Подібна взаємодія призводить до десенсітації рецепторів, пригнічення активності мітохондріальних ферментів і фрагментації нуклеїнових кислот [253]. Процеси пошкодження білків і нуклеїнових кислот під дією АФК відбуваються паралельно з окислювальним пошкодженням ліпідів. Так, гідроксилрадикал і пероксинітрит беруть участь в окисній модифікації тирозинкінази, СОД, глутаматдекарбоксилази та інших ферментів, які беруть участь в утилізації глутамату в астроглії [124]. Крім того, АФК (пероксинітрит і гідроксилрадикал) модифікують (нітروزують або гідроксильнують) антиапоптичні білки, зокрема bcl-2, знижуючи їх функції, а надлишок NO посилює синтез проапоптичних білків FAS і APO-1, що виявляється при ряді нейродеструктивних захворювань. [34]. Наявність в нейроні досить активної тіольної антиоксидантної системи, здатної регулювати транспорт NO, забезпечує і стійкість клітини до нітрузуючого стресу – найбільш ранньому нейродеструктивному механізмові в умовах ішемії [14, 47]. Відомо, що в перші хвилини ішемії мозку NO (макрофагальний або екзогенний) пригнічує окислювальне фосфорилування в мітохондріях клітин-мішеней за рахунок оборотного зв'язування з цитохром-С-оксидазою мітохондрії [199]. Пригнічення електронного транспорту в мітохондрії призводить до генерації супероксиду і, як наслідок, утворення ONOO- [106]. Синтез пероксинітриту спостерігається в клітинах з високою активністю NO-синтази і ферментів, які продукують АФК (ксантінооксидаза, НАДН-оксиредуктаза, циклооксигеназа, ліпоксигеназа, ферменти електронно-транспортного ланцюга). Останніми дослідженнями встановлено, що на початкових стадіях ішемії рівень пероксинітриту може знижуватися за допомогою мітохондріальної нітроредуктази, яка відновлює його за допомогою НАДФН і НАДН в NO [103]. Мішенями окисної і

нітрозуючої атаки пероксинітриту є Меркаптани, CO₂, металопротеїни, нуклеїнові кислоти, метаболітотропні трансмітери і ліпіди [243].

При формуванні у щурів хронічної алкогольної інтоксикації в гомогенаті мозку було відзначено підвищення рівня вільних метаболітів оксиду азоту і NO-синтази при одночасному зниженні показників L-аргініну, каталази і супероксиддисмутази, яскраво виражене в групі контролю (табл.4.5).

Таблиця 4.5

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на показники системи оксиду азоту в головному мозкові щурів на фоні 30-денної хронічної алкогольної інтоксикації і подальшого 14-денного лікування

Групи тварин	метаболіти оксиду азоту (NO ₂ ⁻), мкМ/грам	NO-синтаза, нмоль/мг/білка/хв	L-аргінін, мкмоль/грам тканини	Каталаза, мкат/мг білка	СОД, у.о./мг білка/ хв
Інтакт (n=10)	4,84±0,83	2,41±0,37	3,67±0,44	9,37±1,67	267,3±23,5
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	16,90±1,6	6,02±0,97	0,77±0,08	2,47±0,37	89,7±4,9
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	15,86±1,5 (-6%)	5,76±0,75 (-4%)	0,79±0,06 (+2%)	5,11±0,71* (+106%)	121,3±13,4* (+35%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	7,67±0,68* ¹ (-54%)	2,43±0,21* ¹ (-59%)	3,08±0,4* ¹ (+289%)	8,61±0,75* ¹ (+248%)	233,7±25,1* ¹ (+160%)

Примітка:* – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Проведений 14-денний курс лікування Ангіоліну привів до того, що рівень стабільних метаболітів NO і NO-синтази знизився відповідно в даній групі тварин на 54% і 59% по відношенню до групи контролю. У той же час

відмічено підвищення показників L-аргініну, каталази і СОД відповідно в головному мозку тварин, які отримували Ангіолін на 289%, 248% і 160% по відношенню до групи контролю. Мілдронат не впливав на показники системи оксиду азоту в головному мозку щурів з хронічною алкоголізацією [143, 195, 289].

Результати дослідження визначили найбільш ефективний препарат - Ангіолін, який за всіма вищевказаними параметрами практично наближався до групи інтакту. Отримані дані не суперечать результатам наших попередніх досліджень, якими показано, що Ангіолін, в умовах гострої і хронічної ішемії головного мозку, гальмує формування мітохондріальної дисфункції і продукцію АФК біоенергетичними системами, знижує прояви глутаматної ексайтотоксичності, тим самим знижуючи вироблення АФК нейрональної NOS за рахунок посилення афінності ГАМК-бензодіазепінового рецепторного комплексу, а також підвищує рівень відновлених інтермедіатів тіол-дисульфідної системи [28, 87, 133]. Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що Ангіолін значно підвищує активність СОД, а також активність ферментів, що регулюють тіол-дисульфідну рівновагу в клітині - глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансферази і глутатіонпероксидази в головному мозку при ішемії [11, 36, 65, 125, 246]. Нормалізація тіол-дисульфідної системи під дією Ангіоліну призводить до підвищення її відновлених ітермедіатів і підвищення рівня мітохондріального глутатіону[29, 56, 106, 295].

4.1.3. Вплив Ангіоліну на показники енергетичного метаболізму в головному мозкові при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації при лікувальному режимі введення

На фоні алкогольного пошкодження мозку відбуваються виражені порушення енергетичного метаболізму, при яких розвивається стійкий енергетичний дефіцит [35, 196]. Хронічний алкоголізм призводить до

формування вторинної мітохондріальної дисфункції [109]. Можна говорити про мітохондріальну дисфункцію як про новий патобіохімічний механізм нейродегенеративних розладів широкого спектру [314, 316]. На даний момент виділяють два види мітохондріальної дисфункції – первинну – як наслідок вродженого генетичного дефекту, і вторинну, що виникає під дією різних факторів: гіпоксії, ішемії, оксидативного і нітрозуючого стресу, експресії прозапальних цитокінів. У сучасній медицині все більш значуще місце займає учення про полісистемні порушення клітинного енергообміну, так звана мітохондріальна патологія, або мітохондріальна дисфункція [47, 196]. З явищем мітохондріальної дисфункції тісно пов'язана гіперекспресія ранніх генів – c-fos. Так, в умовах гіперпродукції АФК нейрохімічними і біоенергетичними системами головного мозку в умовах токсичного пошкодження головного мозку, а також при ряді інших нейродеструктивних патологічних процесів відбувається активація експресії редокс-чутливих генів, багато з яких необхідно для захисту клітин від токсичних ефектів окисного стресу. Так, при нормальній концентрації кисню в оточуючому клітину середовищі (нормоксія) під дією АФК відбувається в основному активація JunB, ATF-2 – факторів транскрипції, а в умовах окисного стресу - переважно факторів c-Jun і c-fos. [27]. Активація саме цих факторів транскрипції в умовах гіперпродукції АФК пояснюється тим, що JunB і c-fos містять в своїх ДНК-зв'язуючих доменах високочутливі до АФК залишки цистеїну - Cys252, Cys54, Cys61. Окислення їх SH-груп призводить до зворотної інактивації AP-1 і NF-kB. Крім цього, білок c-fos безпосередньо бере участь в процесі фрагментації мітохондріальної ДНК та ініціювання процесів апоптотичної загибелі нейрональної клітини. C-fos відповідальний за гіперпродукцію NO при нейродеструктивних захворюваннях за допомогою активації індукбельної NO-синтази. C-fos являє собою одну з основних ядерних цілей для передачі сигналів регуляції клітинного росту і трансформації, він залучений у безліч клітинних функцій, в тому числі в процес клітинної проліферації і диференціювання [27, 34].

Усе вищевикладене є обґрунтуванням для пошуку високоефективних нейропротективних препаратів, здатних запобігати негативним процесам мітохондріальної дисфункції в клітині, тим самим надаючи енерготропну дію [109, 216].

Хронічна алкоголізація щурів приводила до стійких порушень енергетичного обміну в головному мозку - до зниження вмісту АТФ, АДФ і підвищення АМФ на фоні гіперпродукції лактату і зниження малату і пірувату. Однак гліколіз не компенсує потреби клітини в макроергах, замикаючи коло енергетичного дефіциту [74]. Надмірне утворення протонів відбувається внаслідок накопичення недоокислених продуктів вуглеводневого і ліпідного обміну, гідролізу АТФ та інших макроергічних сполук в результаті накопичення відновлених піридиннуклеотидів і продуктів гліколізу, призводячи до розвитку некомпенсованого метаболічного ацидозу [112]. На початковому етапі порушень енергетичного обміну при ішемії, гіпоксії і т.д. в мітохондріях знижується швидкість аеробного окислення. Це веде до зменшення кількості АТФ і зростання вмісту аденозиндифосфату (АДФ) і аденозинмонофосфату (АМФ) та, як наслідок, до зниження коефіцієнта $\text{АТФ/АДФ} + \text{АМФ}$. При низькому співвідношенні $\text{АТФ/АДФ} + \text{АМФ}$ активується фермент гексокіназа (ГК), що дозволяє різко збільшити пропускну здатність реакцій гліколізу. Клітина в цих умовах витрачає глікоген, забезпечуючи себе енергією за рахунок безкисневого розпаду глюкози [211, 319]. На цьому етапі ще може йти адаптація до гіпоксії і стабілізація енергообміну. Однак така стабілізація зазвичай буває недовгою і супроводжується досить швидким виснаженням запасів глікогену і гліколіз не здатний тривалий час і в повному обсязі забезпечувати енергетичні потреби головного мозку. Кінцевим продуктом гліколізу є лактат, наростання якого провокує внутрішньоклітинний ацидоз. На ранніх етапах ішемії клітинний ацидоз можна розглядати як захисну реакцію, так як зниження рН надає стабілізуючу дію на клітинні мембрани [222, 314]. Однак прогресування ацидозу викликає денатурацію

деяких білків і формування в цитоплазмі зерен, що проявляється в появі помутніння цитоплазми («мутне набухання», «зерниста дистрофія»). Посилене вивільнення лактату при гіпоксії дає метаболічний лактатацидоз, який блокує активність генів, що лімітує адаптацію. На цій стадії гіпоксії в клітині формується справжній дефіцит АТФ, оскільки аеробний механізм не працює через кисневий дефіцит, а анаеробний – через ацидоз. У зв'язку з цим, стійкість до гіпоксії формується за рахунок перебудови енергетичних шляхів, яка передбачає мобілізацію механізмів поставки протонів для окисного фосфорилування і економного використання відсутнього кисню [207, 233, 234, 269].

Курсове призначення Мілдронату після 30-денної алкогольної інтоксикації призвело до подальшого підвищення рівня лактату по відношенню до групи нелікованих тварин ($p \leq 0,05$), при незмінному рівні малату й пірувату в головному мозку тварин, що свідчить про активацію реакцій гліколізу (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на показники енергетичного метаболізму в головному мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Групи тварин	Лактат, мкмоль/г тканини	Малат, мкмоль/г тканини	Піруват, мкмоль/г тканини
Інтакт (n=10)	2,10±0,06	0,48±0,03	0,85±0,04
Контроль(хронічна алкоголізація) (n=10)	4,70±0,16	0,37±0,02	0,60±0,03
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	5,69±0,30* (+21%)	0,39±0,02 (+5%)	0,66±0,03 (+10%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	2,32±0,16* ¹ (-50%)	0,64±0,03* ¹ (+73%)	0,80±0,04* ¹ (+33%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Призначення Ангіоліну призводило до зменшення вмісту лактату на 50% і підвищення малату на 73% і пірувату – на 33%, що свідчило про інтенсифікацію аеробних процесів в циклі Кребса. Інтенсифікація аеробних процесів під дією Ангіоліну в мозку тварин, які отримували тривалий час алкоголь, приводила до збільшення продукції макроергічних фосфатів. Так, в головному мозку тварин, що отримували Ангіолін, підвищувався рівень АТФ на 80%, АДФ – на 20% при зниженні рівня АМФ на 12% (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на показники аденілових нуклеотидів в головному мозкові щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Групи тварин	АТФ, мкмоль/г тканини	АДФ, мкмоль/г тканини	АМФ, мкмоль/г тканини
Інтакт (n=10)	3,56±0,08	0,43±0,02	0,176±0,02
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	1,77 ±0,05	0,35±0,017	0,227±0,01
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	1,94±0,10 (+9%)	0,37±0,02 (+5%)	0,253±0,02 (+11%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	3,19±0,12* ¹ (+80%)	0,42±0,02* ¹ (+20%)	0,198±0,01* ¹ (-12%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

У групі щурів, що одержували Мілдронат, ці показники були значно нижче в порівнянні з групою, що одержувала Ангіолін. Механізм енергомодулюючої дії Ангіоліну обумовлений його здатністю обмежувати розвиток мітохондріальної дисфункції і активувати компенсаторні шунти

продукції енергії, зокрема малат-аспартатний [42]. Низкою досліджень показано, що продукція енергії в несприятливих для головного мозку умовах (гостра ішемія, гіпоксія, алкогольна інтоксикація) залежить від функціонування малат-аспартатного шунта [48]. В цьому відношенні можна з певною упевненістю сказати, що Ангіолін активує найбільш «вигідний» з точки зору біоенергетики, малат-аспартатний шунт, який, по-перше, більш стійкий до гіпоксії, а, по-друге, забезпечує протонами в екстремальних умовах електронно-транспортний ланцюг, частково заміщаючи сукцинатоксидазний механізм поставки протонів в електронний ланцюг [74]. При цьому зростання малату є маркером продуктивності цієї човникової системи [42].

На фоні хронічної алкогольної інтоксикації у щурів в гомогенаті мозку у групи контролю було виявлено значну активацію ГАМК-ергічної системи, що виражається в підвищенні рівня ГДК і ГАМК-Т, а також зниженні глутамату, ГАМК та гліцину [51, 348]. В результаті проведеного курсу лікування Ангіоліном в головному мозку тварин з хронічною алкоголізацією спостерігалось підвищення рівнів ГАМК, глутамату і гліцину на 157%, 112% і 50% відповідно по відношенню до контролю і зниження ГДК і ГАМК-Т на 17% і 32% відповідно по відношенню до контролю (таблиця 4.8). Комплексне клініко-біохімічне дослідження хворих на алкогольну залежність, що надійшли в клініку в стані алкогольного абстинентного синдрому, показало, що у даних пацієнтів виявлено значний дефіцит ГАМК і гліцину в крові [51]. Призначення Мілдронату не призводило до достовірного впливу на показники ГАМК-ергічної системи головного мозку в умовах алкогольної інтоксикації.

Результати досліджень представлені в таблиці 4.8.

Таблиця 4.8

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на показники системи гальмівних нейромедіаторів в головному мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Групи тварин	ГАМК, мкм/г тканини	Глутамат, мкм/г тканини	Гліцин, мкм/г тканини	ГДК, мкм/г тканини/г	ГАМК-Т, мкм/г тканини/г
Інтакт (n=10)	3,47±0,31	17,36±1,42	4,30±0,33	15,5±0,54	16,5±0,97
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	1,23±0,11	7,21±0,63	2,82±0,27	19,5±1,19	25,7±2,13
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	1,02±0,09 (-17%)	7,13±0,44 (-1%)	2,81±0,23 (-0,3%)	22,01±2,7 (+11%)	27,8±2,14 (+8%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	3,168±0,41* ¹ (+157%)	15,33± 1,03* ¹ (+112%)	4,23± 0,36* ¹ (+50%)	16,2±1,0* ¹ (-17%)	17,3± 0,54* ¹ (-32%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Подібні зміни стану ГАМК-ергічної системи при хронічній алкогольній інтоксикації розцінюють як компенсаторну активацію додаткового шунта утворення енергії в умовах гальмування циклу Кребса. Так, гальмування окислення α -кетоглутарату призводить до активації ГДК і перетворенню глутамату в ГАМК, а потім при активації ГАМК-Т – в янтарний напівальдегід, який, перетворюючись в сукцинат, окислюється в циклі Кребса [51].

При алкоголізації спостерігається гальмування окисної продукції енергії, активація компенсаторних шляхів утворення АТФ-гліколізу і шунта Робертса, які, однак, не забезпечують повністю потребу мозку в енергії і викликають розвиток лактат-ацидозу і дефіцит гальмівних амінокислот – ГАМК і гліцину.

При формуванні хронічної алкогольної інтоксикації виникають патобіохімічні реакції вільно-радикального окислення, енергодефіцит, дефіцит інтермедіатів ГАМК-ергічної системи і гальмівних амінокислот, що представляють собою потенційну мішень для фармакокорекції. Корекція вільно-радикального окислення призводить до гальмування окисної модифікації і інактивації білкових макромолекул - ключових ферментів біоенергетичних процесів нейрона, гіперполяризації мембран мітохондрій, порушення тіосульфідної системи механізмів red-ox-регуляції, окислювальної модифікації нуклеїнових кислот, тим самим запобігаючи гальмуванню експресії генів, відповідальних за синтез ряду ферментів окисного метаболізму [20, 144].

Таким чином, хронічна алкогольна інтоксикація протягом 30 діб призводить на 15 добу відміни етанолу до вираженого гальмування окисної продукції енергії, активації компенсаторних шляхів утворення АТФ – гліколізу і шунта Робертса, які, однак, не забезпечують повністю потребу мозку в енергії і викликають розвиток лактат-ацидозу і дефіцит нейротрансмітерних амінокислот – ГАМК і глутамату, а також і гліцину. Корекція порушень окисного метаболізму Ангіоліну внаслідок хронічної алкогольної інтоксикації підвищує активність власних біоенергетичних процесів за рахунок «підключення» додаткових шунтів енергетичного метаболізму мозку і інтенсифікації аеробних реакцій окиснення субстрату, а також обмежує активність шунта Робертса і, тим самим, «зберігає» ресурси ГАМК і глутамату. Отримані результати демонструють позитивний вплив Ангіоліну на енергетичний метаболізм головного мозку після хронічної алкогольної інтоксикації, спрямований на відновлення фонду макроергів, за

рахунок нормалізації реакцій в циклі Кребса і активації енергетично більш «вигідних» шунтів енергії, і є експериментальним обґрунтуванням застосування препарату в лікуванні алкогольної хвороби [353].

4.1.4. Вплив Ангіоліну на морфометричні показники СА-1 зони гіпокампу і процеси апоптозу при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації при лікувальному режимі введення

Інтоксикація алкоголем, що триває роками, викликає стійкі морфологічні зміни в різних органах. У пацієнтів з хронічним алкоголізмом виявлені дифузні зміни, поширені по всій нервовій системі і місцеві ураження (місцевий паренхіматозний розпад, гліозні рубці, крововиливи, переважно розташовані в певних місцях, головним чином під епендимною на дні III шлуночка, у Сільвієвому водопроводі); відзначаються також зміни в периферійних нервах [20, 291]. Нейрони головного мозку характеризуються станом гострого набухання, вакуольної дистрофії, атрофічними змінами [8, 11]. Гліальна тканина зазнає осередкової і дифузної проліферації. Судини мозку частіше повнокровні, стінки їх склерозовані. Іноді в мозку хворих, які страждають на хронічний алкоголізм, знаходять петрифікати, дрібні кісти, осередки демієлінізації. При введенні етанолу ряд міжнейрональних контактів має різні реактивні зміни у вигляді набрякання аксональної частини синапсів, зміни кількості, форми, осміофільності і розташування везикул. Поряд з цим зустрічаються контакти аксонних терміналей з шипиками дендритів, які мають зміни деструктивного характеру. В основному дегенерація зустрічається по світлому типу. Пресинаптичний відділ зменшений в розмірі, осміофільний і переповнений везикулами, що свідчить про блокаду медіатора. Важливе значення має і зміна шипикового апарату, так як цьому утворенню, поряд з синаптичними мембранами, надається важливе значення в процесі сприйняття і формування тимчасових зв'язків [26]. Досить типовим для дії алкоголю є зниження інформативності

міжнейронних контактів, що морфологічно визначається зменшенням площі контактування активних зон синаптичних мембран і розширенням синаптичної щілини. У всіх випадках навколо змінених міжнейрональних контактів спостерігається набряк астроцитарної глії. Таким чином, при хронічній алкогольній інтоксикації, у зв'язку зі змінами в синапсах, спостерігається часткове роз'єднання міжнейрональних ансамблів і, як наслідок цього, з'являється морфо-функціональна основа розвитку алкогольної хвороби і асоціальної поведінки індивідуума [21, 315].

На рисунку 4.1 представлені фотографії нейронів СА-1 зони гіпокампу щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням.

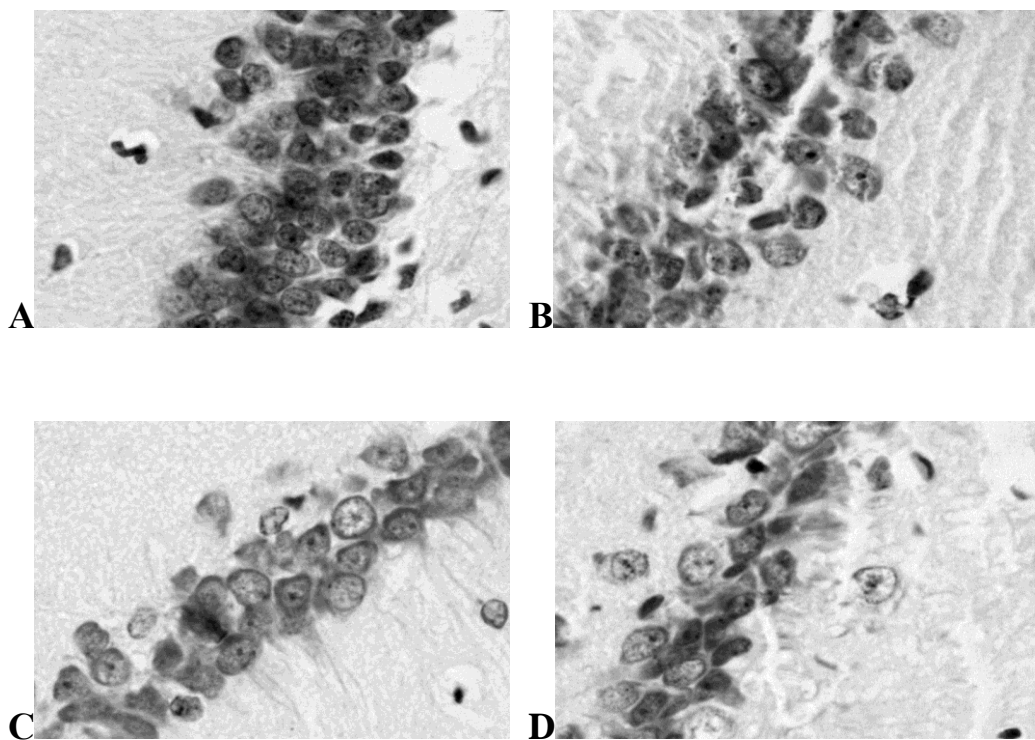


Рисунок 4.1 Картина нейродегенерації після 30-денної алкогольної інтоксикації і подальшого 14-денного лікування (застосовувалося забарвлення галоціанін-хромовим галуном по Ейнарсону, збільшення x40).

А – СА-1 зона гіпокампу у тварин групи інтакту;

В – СА-1 зона гіпокампу у тварин контрольної групи;

С – СА-1 гіпокампу у тварин групи Ангіоліну;

Д – СА-1 зона гіпокампу у тварин групи Мілдронату.

При проведенні морфометричних досліджень ми визначали такі показники:

- щільність нейронів, гліальних клітин, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (кількість клітин на 1 мм² площі зрізу кори мозку);
- площа тіл нейронів, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (мкм²);
- концентрація РНК в нейронах, апоптотичних і деструктивно змінених нейронах (одиниці оптичної щільності, ООЩ), які розраховували як логарифм відношення оптичної щільності тіла клітини до оптичної щільності міжклітинної речовини.

Токсичний вплив етилового спирту на нейрони СА-1 зони гіпокампу яскраво проявлявся в контрольній групі, яка отримувала тільки етанол. Щільність нейронів в цій групі знизилася за час насильницької алкоголізації до 804±80,9нейрон/мм², в той час як в інтактній групі цей показник склав 1442,5±132,1нейрон/мм² (табл. 4.9).

Після 14-денної терапії Мілдронатом щільність нейронів склала на 18% більше по відношенню до контролю, а після терапії Ангіоліну – на 49,3% більше в порівнянні з контролем.

Таблиця 4.9

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на щільність нейронів, площі тіл нейронів, вміст РНК в зоні СА-1 гіпокампу щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Досліджувані показники	Щільність нейронів (нейрон/мм ²)	Площа нейронів(мкм ²)	Вміст РНК (E _{оп})
1	2	3	4
Інтакт (n=10)	1442,5±132,1	161,6±14,2	15,18±1,1
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	804±80,9	111,0±7,2	9±0,7

Продовження таблиці 4.9

1	2	3	4
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	951,1±77,2* (+18%)	120±11,7 (+8%)	9,87±0,87 (+9%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	1201,8±105,5* ¹ (+49,3%)	151,7±15,1* ¹ (+36%)	14,82±1,7* ¹ (+64%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Подібні зміни були відзначені і щодо показника площі нейронів - в контрольній групі він знизився до $111,0 \pm 7,2 \text{ мкм}^2$ в порівнянні з $161,6 \pm 14,2 \text{ мкм}^2$ групи інтакту. Проведена експериментальна терапія впливала на цей показник. Так, Мілдронат поліпшив цей показник тільки на 8% в порівнянні з контролем, а Ангіолін - на 36% вище по відношенню до контролю. Так само підвищився вміст РНК в групі Мілдронату на 9%, в групі Ангіоліну - на 64% по відношенню до контролю. Виявлені зміни, на нашу думку, відображають характер пошкодження нейронів в умовах хронічної алкогольної інтоксикації, яка полягала в значному зменшенні структурних і пластичних компонентів клітин. Курсове призначення Ангіоліну демонструвало більш виражену нейропротективну дію, ніж Мілдронат, яка характеризувалася відновленням щільності та площі тіл нейронів у порівнянні з інтактною групою тварин, а також значним відновленням вмісту РНК в клітинах [296]. Таким чином, за результатами морфо-гістохімічного аналізу нейронів СА-1 зони гіпокампу Ангіолін демонстрував позитивні ефекти на репаративні процеси в нейронах, забезпечуючи тим самим нейропротекцію в умовах хронічної алкогольної інтоксикації [229].

Зміна гліальних структур під впливом алкоголю проявилася у зменшенні щільності гліальних клітин в групі контролю до $303,9 \pm 41,2 \text{ нейрон/мм}^2$, в той час як у інтактної групи щільність гліальних

клітин склала $450,3 \pm 51,7$ нейрон/ мм^2 . Мілдронат підвищив цей показник на 3,6%, а Ангіолін - на 38,7% по відношенню до контрольної групи.

Результати досліджень представлені в таблиці 4.10.

Таблиця 4.10

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на щільність глії, площу глії, вміст РНК в зоні СА-1 гіпокампу щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Досліджувані показники	Щільність гліальних клітин (нейрон/ мм^2)	Площа гліальних клітин (мкм^2)	Вміст РНК ($E_{\text{оп}}$)
Інтакт (n=10)	$450,3 \pm 51,7$	$25,1 \pm 3,3$	$6,1 \pm 0,55$
Контроль (хронічна алкоголізація)(n=10)	$303,9 \pm 41,2$	$18,2 \pm 2,34$	$3,87 \pm 0,43$
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	$314 \pm 85,9$ (+3,6%)	$19,7 \pm 2,4$ (+8%)	$4,00 \pm 0,80$ (+3%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	$421,8 \pm 31,3^{*1}$ (+38,7%)	$24,7 \pm 3,1^{*1}$ (+36%)	$6,23 \pm 0,87^{*1}$ (+61%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Досліджувані препарати також збільшили площу гліальних клітин: в групі Мілдронату – на 3,6%, в групі Ангіоліну – на 38,7% по відношенню до групи контролю. Також підвищився вміст РНК в ядрах гліальних клітин: в групі Мілдронату – на 3%, а в групі Ангіоліну – на 61,0% по відношенню до групи контролю.

Накопичення в нейрональній клітині продуктів окисної модифікації ліпідів, білків, нуклеїнових кислот в умовах хронічної алкогольної

інтоксикації, як було зазначено вище, може призводити до токсичної і апоптичної загибелі певної популяції нервових клітин [112].

Аналіз щільності деструктивно змінених і апоптичних нейронів в СА-1 зоні гіпокампу показав, що хронічна алкогольна інтоксикація супроводжувалася збільшенням щільності пошкоджених клітин на 132,0% по відношенню до інтакту.

Результати досліджень представлені в таблиці 4.11.

Таблиця 4.11

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на щільність апоптичних і деструктивно змінених клітин в зоні СА-1 гіпокампу головного мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Досліджувані показники	Щільність апоптотичних клітин на 1 мм ²	Доля апоптичних клітин, %
Інтакт (n=10)	78,3±8,11	4,2±0,80
Контроль (хронічна алкоголізація)(n=10)	181,6±21,0	19,8±2,21
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	167,7±15,1 (-7%)	17,0±2,12 (-14%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	112,2±12,33* ¹ (-38%)	8,83±0,92* ¹ (-55%)

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Введення препарату Мілдронат призводило до значного зниження щільності деструктивно змінених нейроцитів (на 7%), не досягаючи при цьому рівня інтактною групи (78,3±8,11 на 1 мм²). Терапія Ангіоліном призвела до значного зниження кількості апоптичних і деструктивно змінених нейронів – на 38 % менше, ніж у контрольної групи. Важливо

відзначити, що наявність деструктивно змінених нейронів у інтактної групи тварин пояснюється природною загибеллю клітин. В умовах хронічної алкогольної інтоксикації такі клітини в першу чергу піддаються апоптозу. Очевидно, що Ангіолін проявляв нейропротективну дію головним чином на функціонально повноцінні нейрони, попереджуючи в них деструктивні процеси.

Після терапії Ангіоліном і Мілдронатом також знизилася частка апоптотичних клітин: в групі Мілдронату – на 14%, а в групі Ангіоліну – на 55% по відношенню до групи контролю, де цей показник склав $19,8 \pm 2,21$ в той час як в групі інтакту частка апоптотичних клітин склала $4,2 \pm 0,80$. Ці дані свідчать про зниження антиапоптотичного захисту і активації процесів некрозу і апоптозу. Активація нейроапоптозу, на думку багатьох дослідників, є першопричиною розвитку стійких порушень когнітивно-мнестичних функцій ЦНС [233]. Нейроапоптоз розвивається як каскадний процес, який супроводжується активацією (індукцією утворення) специфічних про- чи антиапоптотичних білків, а також особливих протеолітичних ферментів – каспаз [142]. Серед факторів запуску апоптозу слід зазначити утворення активних форм кисню в процесі «спотвореного» шляху окисного метаболізму в клітині. Існують переконливі докази того, що центральна роль в продукції АФК і подальшому розвитку апоптозу і некрозу належить мітохондріям, зміні проникності їх мембран в результаті формування специфічного комплексу мітохондріальних пор і ініціювання мітоптозу [164]. Надлишок NO пригнічує ферменти, відповідальні за репарацію ДНК, показано дію на алкілтрансферазу, формамідопіримідин-ДНК-глікозилазу і лігази. NO активує PARP та АДФ-рібозилування, особливо на фоні дефіциту АТФ і накопичення відновлених піридиннуклеотидів. NO позитивно впливає на синтез білка p53, який індукує експресію Bax, Fas, p53AIP (apoptosis inducing protein) і інших апоптогенних білків, а також переміщається в мітохондрії при апоптозі, що може бути однією з причин вироблення АФК і зниження трансмембранного потенціалу на внутрішній мембрані [199].

Нейроапоптоз контролюється білками сімейства Bcl-2. Саме вони регулюють апоптоз на рівні мітохондрій. Одні з білків цього великого сімейства (Bcl-2, а також Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Al і Boo) запобігають апоптозу; інші (Bax, Bad, Bcl-xS, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk, і Mtd) сприяють його ініціації. Bcl-2 діє як нейроантиоксидант - блокує вихід цитохрому С і запобігає розвитку апоптозу [38, 164]. У запускові апоптозу, викликаного ушкодженнями ДНК, активацією онкогенів і гіпоксією, бере участь білок 53 (p53), взаємодіючи з Bax, стимулюючи «рецептори смерті» і апоптозні гени. p53 активує модулятор суїциду PUMA (p53 upregulated modulator of APOptosis), який потім пов'язує Bcl-2 і виводить з ладу цей білок, що перешкоджає апоптозу. Всі білки цього сімейства багато в чому гомологічні, що дозволяє їм взаємодіяти між собою. Співвідношення білків Bcl-2 агоністів і антагоністів апоптозу визначає здатність клітини, в тому числі і нейрона, відповідати на апоптотичні сигнали. Допускається, що антиапоптотична дія Bcl-2 пов'язана з нормалізацією функції мітохондрій, які беруть участь в реалізації апоптозу. Конкретними механізмами цього процесу є:

- 1) блокування вивільнення з мітохондрій цитохрому-С;
- 2) участь білків Bcl-2 в формуванні трансмембранних мітохондріальних пор, що визначає трансмембранний потенціал, а також вивільнення різних активних сполук та іонів з мітохондрій;
- 3) можливість проникнення цих білків в ліпідні структури мембран і формування іонних каналів, що має значення в субклітинному розподілі Ca^{2+} між ядром, мітохондріями і ендоплазматичним ретикуломом [109].

В головному мозкові щурів (гіпокамп), що підлягали хронічній алкоголізації, нами було встановлено зниження концентрації антиапоптотичного білка Bcl-2.

Результати досліджень представлені в таблиці 4.12.

Таблиця 4.12

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на експресію білка Bcl-2 в головному мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Група тварин	Площа забарвленої плями, мм ²	Оптична концентрація забарвленого комплексу, оптична щільність	Вміст білка Bcl-2, усл.ед.
Інтакт (n=10)	58,27	0,17±0,02	6,78±0,41
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	57,32	0,03±0,001	0,95±0,07
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	59,77	0,04±0,002* (+33%)	1,26±0,072* (+32%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	54,81	0,10±0,02* ¹ (+233%)	5,32±0,61* ¹ (+460%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

У гіпокампі щурів, які отримували курсове лікування Мілдронатом або Ангіоліном реєструвалося підвищення концентрації білка Bcl-2 в порівнянні з групою нелікованих тварин. Так, введення тваринам Ангіоліну забезпечувало збільшення цього показника в 4,6 рази, призначення Мілдронату – в 1,32 рази.

Збільшення вмісту білка Bcl-2 в головному мозку тварин, які отримували препарати, свідчить про активацію антиапоптотичного захисту пошкоджених нейронів (рис. 4.2).

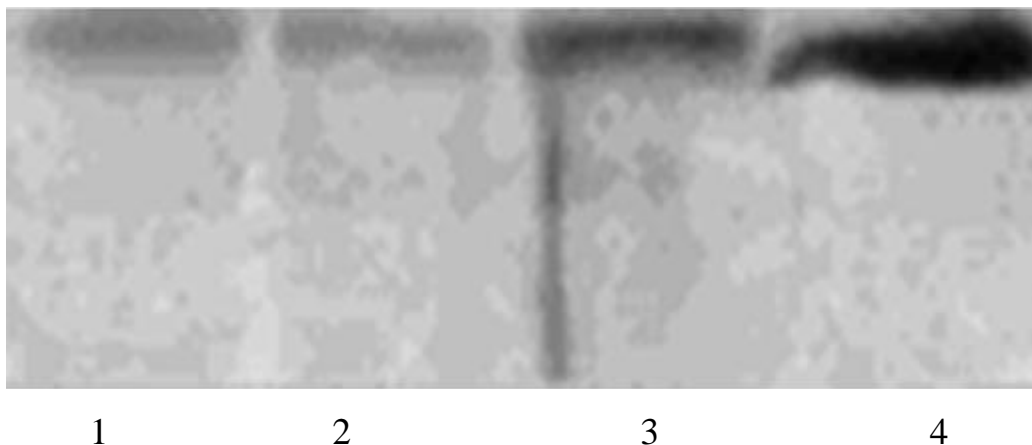


Рисунок 4.2. Експресія білка Bcl-2 в головному мозкові щурів (електрофореграма)

1- Мілдронат; 2 - Контроль; 3 - Ангіолін; 4 - Інтакт.

Таким чином, Ангіолін демонструє досить високу нейропротективну дію в умовах алкогольного ураження ЦНС і по низці показників достовірно перевершує аналогічну дію референс-препарату Мілдронат. В умовах хронічної алкогольної інтоксикації Ангіолін в дозі 100 мг/кг приводив до достовірного збільшення щільності нейронів і гліальних клітин, вмісту в них РНК, зменшував кількість апоптичних і деструктивно змінених нейронів, а також підвищував індекс виживання нейронів і підвищував експресію антиапоптотичного білка Bcl-2.

4.1.5. Вплив Ангіоліну на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів судин головного мозку

Вивчення судинного компонента кори головного мозку, представленого капілярною мережею, показало, що проведення 30-добової хронічної алкоголізації приводить на 45 добу спостереження до зниження щільності ядер ендотеліоцитів капілярів на 31% на одиницю площі зрізу кори головного мозку в порівнянні з інтактними тваринами (таблиця 4.13). Це відображає процеси дегенерації кори мозку, закриття капілярів і зменшення щільності функціонуючих. Отримані результати свідчать про формування

ендотеліальної дисфункції судин головного мозку після хронічної алкогольної інтоксикації. За сучасними уявленнями ендотеліальна дисфункція є одним з провідних патогенетичних ланок серцево-судинних захворювань [57, 82, 317]. Результати експериментальних і клінічних досліджень останніх років підтвердили концепцію про важливий причинно-наслідковий взаємозв'язок між ендотеліальною дисфункцією і прогресуванням і / або розвитком артеріальної гіпертонії і гіпертонічної енцефалопатії, атеросклерозу, хронічної серцевої недостатності, цукрового діабету, метаболічного синдрому, хронічної ниркової недостатності і їх ускладнень, легеневої гіпертензії, дилатаційної кардіоміопатії, ожиріння, гіперліпідемії, гіпергомоцистеїнемії, хронічної церебральної ішемії [137, 166]. Основним механізмом, що лежить в основі ЕД, є зниження утворення і біодоступності оксиду азоту (NO), при одночасному підвищенні рівня супероксиданіону і продукції потужних вазоконстрикторів. Таким чином, дисфункція ендотелію проявляється дисбалансом між медіаторами, що забезпечують в нормі оптимальне протікання всіх ендотелійзалежних процесів [44, 103]. Порушення продукції, взаємодії, руйнування ендотеліальних вазоактивних факторів спостерігаються одночасно з аномальною судинною реактивністю, змінами в структурі і рості судин, яким сприяють судинні захворювання [130]. Ендотеліальна дисфункція - системна патологія, сполучена з порушенням мікроструктури і секреторної функції ендотеліальних клітин, що призводить до зниження ендотелійзалежної вазодилатації, гіперкоагуляції, підвищеного тромбоутворення, збільшенню судинної проникності і міграції ліпопротеїдів в інтиму судин, проліферації гладком'язових клітин і ремоделюванню судин [57, 82, 317].

Основним механізмом, що лежить в основі ендотеліальної дисфункції, є зниження утворення і біодоступності оксиду азоту (NO) на фоні підвищення продукції потужних вазоконстрикторів [52, 58]. При цьому основними причинами дефіциту NO в ендотеліальних клітинах можуть бути: знижений вміст попередника оксиду азоту - L-аргініну, зниження експресії

або активності ендотеліальної синтази оксиду азоту, недолік кофакторів синтезу NO (особливо тетрагідробіоптерину), підвищення рівня ендогенних інгібіторів eNOS асиметричного диметиларгініну і монометил- L-аргініну, підвищене утворення реактивних форм кисню (зокрема, супероксиданіону), а також ліпопротеїдів низької щільності (особливо їх окислених форм) [143, 305].

Таблиця 4.13

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на морфо-функціональну характеристику ендотеліоцитів капілярів IV-V шарів кори головного мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Експериментальні групи	Щільність ядер на 1 мм ² кори	Площа ядер, мкм ²	Діаметр ядер, мкм ²	Концентрація РНК в ядрах, E _{оп}
Інтакт (n=10)	887±14	8,34 ±0,07	2,77±0,01	0,293±0,002
Контроль (хронічна алкоголізація)(n=10)	613±17	7,11±0,05	2,15±0,01	0,228±0,001
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	637±11 (+4%)	7,38±0,09 (+3%)	2,56±0,01 (+19%)	0,227±0,002 (-0,4%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	850±12* ¹ (+38%)	8,65±0,05* ¹ (+21%)	2,82±0,01 (+31%)	0,313±0,001* ¹ (+37%)

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Моделювання хронічної алкогольної інтоксикації супроводжувалося падінням концентрації РНК в ядрах ендотеліоцитів капілярів на 22% в порівнянні з інтактними тваринами.

Введення протягом 15 діб Ангіоліну після хронічної алкогольної інтоксикації надавало протективний ефект на ендотелій капілярів, що проявлялося достовірним збільшенням щільності ядер ендотеліоцитів (38%) на одиницю площі зрізу кори, площі ядер (21%) і підвищенням в них концентрації РНК на 37%, що може свідчити про відновлення капілярної мережі в корі головного мозку тварин, які отримували 30 діб етиловий алкоголь. Вищевикладене свідчить про ендотеліопротективну дію Ангіоліну, яка призводить до ревазуляризації і компенсації потужності капілярного кровопостачання кори головного мозку в умовах хронічної алкогольної інтоксикації [44, 207]. Призначення тваринам після хронічної алкоголізації референс-препарату «Мілдронат» в дозі 250 мг/кг не проявляло протективної дії щодо ендотелію капілярів кори мозку [44].

Для більш детальної характеристики процесів ревазуляризації були вивчені ступінь зв'язування фактора росту ендотелію судин (VEGF) і характеру проліферативної активності ендотелію капілярів за 15 днів. Встановлено, що алкогольне пошкодження мозку приводило до достовірного зниження зв'язування VEGF з судинним ендотелієм капілярної мережі кори, а введення Ангіоліну позитивно впливало на цей процес, про що свідчило підвищення на 88,2% концентрації фактора росту ендотелію (VEGF) (таблиця 4.16). Дія потенційних ендотеліопротекторів може бути пов'язана з активацією зростання судин, в якій ендотелій бере безпосередню участь [294]. У стабільному стані ендотеліоцити не проліферують і лише зрідка (1 раз в 7-10 років) діляться. При фармакологічній модуляції ангіогенних факторів росту і цитокінів відбувається активація проліферації ендотеліоцитів, яка завершується їх диференціюванням і подальшим «дозріванням» судини або її ремоделюванням, після чого заново сформована судина переходить в стабільний стан. Процес ангіогенезу є необхідним для тривалої адаптації тканин в умовах пошкодження. При цьому спостерігається підвищення концентрації факторів росту в тканинах і, частково, в крові, що має значення для оцінки ендотеліопротективної дії потенційного препарату.

На нашу думку, формування ендотеліальної дисфункції прямо пов'язане зі зменшенням експресії і дефіцитом васкулоендотеліального фактору росту (VEGF). За цей дефіцит відповідальні прозапальні цитокіни, вільні радикали, надлишок оксиду азоту, вазоактивні медіатори [44]. Експериментальні дані свідчать, що фармакологічна стимуляція експресії VEGF в підданому стресові ендотелії призводить до гальмування прогресування патології і органопротекції. Однак, у зв'язку з тим, що стимуляція VEGF-залежного ангиогенезу збільшує ризик розвитку пухлин, а у хворих на цукровий діабет – ризик ретинопатії, питання про фармакологічну стимуляцію VEGF при ендотеліальній дисфункції залишається дискутабельним. Проте необхідно розглядати VEGF як перспективну мішень ендотеліопротекції, що можливо з точки зору не фармакологічної стимуляції, а фармакологічної модуляції [294].

VEGF - гетеродимерний глікопротеїновий ростовий фактор, що продукується різними типами клітин [294]. Варіанти VEGF позначаються як VEGF-A; -B, -C, -D. VEGF-A є переважаючою формою для більшості тканин. На відміну від інших мітогенів ендотеліальних клітин, таких як bFGF (основна форма) і PDGF, VEGF синтезується як попередник, що містить 226 амінокислот. VEGF – потенційний мітоген для епітеліальних клітин судин. Зі здатності VEGF впливати на проникність судин впливає можливість залучення цього ростового фактора в зміні функцій гематоенцефалічного бар'єру в нормальних і патологічних умовах. VEGF-A є причиною вазоділятації через NO-синтезний шлях в ендотеліальних клітинах і може активувати міграцію моноцитів. Сімейство VEGF і їх рецепторів бере участь у розвитку та зростанні ендотелію судин [82, 97]. При різних експериментальних патологіях (інфаркт міокарда, порушення мозкового кровообігу за типом ішемічного інсульту, хронічна серцева недостатність) виявляється, в залежності від тривалості патологічного процесу, підвищення і зниження експресії VEGF-A в ендотеліоцитах судин м'язового типу і зміна його концентрації в крові тварин. Так, встановлено кардіопротективну і

ендотеліопротективну активність надмалих доз препарату VEGF на моделі дисфункції ендотелію, викликаній тривалим введенням інгібітора NOS-L-NAME [102, 275]. Гіперекспресія VEGF-A безпосередньо пов'язана з патологічними процесами, асоційованими з посиленням ангіогенезу або збільшенням проникності судин (злоякісні новоутворення, ревматоїдний артрит, псоріаз, діабетичні ангіопатії). VEGF-C належить сімейству VEGF. Показано, що він володіє ангіогенними і лімфангіогенними властивостями. Два білки цього сімейства, VEGF-C і -D, надають регуляторний вплив на ендотеліальні клітини лімфатичних судин через рецептор VEGFR3, діючи як мітогени. Зміна концентрації (підвищення, а потім зниження експресії) VEGF-C в ендотеліоцитах капілярів виявлено при ряді експериментальних патологій серцево-судинної системи, а гіперекспресія VEGF-C асоційована з онкогематологічними захворюваннями.

Хронічна алкоголізація пригнічувала проліферативну активність судинного ендотелію капілярів кори мозку, що виражалось в зниженні щільності проліферуючих клітин на 1 мм² кори на 40,2%. Курсове введення протягом 15 діб після 30-добової алкоголізації таблеткової маси Ангіоліну щурам з хронічною алкогольною інтоксикацією стимулювало проліферативну активність судинного ендотелію, про що свідчило достовірне підвищення щільності проліферуючих ендотеліоцитів на 46,8% площі і діаметра ядер проліферуючих клітин в порівнянні з групою нелікованих тварин.

Отримані дані свідчать про те, що препарат «Ангіолін» проявляє ендотеліопротективну активність в умовах хронічної алкогольної інтоксикації, молекулярний механізм якої пов'язаний з експресією васкулоендотеліального фактора (VEGF) і впливом на проліферативну активність ендотелію в капілярах кори головного мозку. Подібний ендотеліопротективний механізм дії Ангіоліну викликає ефективну реваскуляризацію тканин головного мозку на фоні негативної дії хронічного введення етилового алкоголю(табл. 4.14) [44].

Таблиця 4.14

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на морфо-функціональну характеристику проліферуючих ендотеліоцитів капілярів IV-V шарів кори головного мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Експериментальні групи	Щільність проліферуючих клітин на 1 мм ² стінки судин	Площа ядер, мкм ²	Діаметр ядер, мкм ²	Концентрація фактора росту ендотелію, (VEGF), E _{іФ}
Інтакт (n=10)	771±26	6,77±0,10	2,88±0,02	0,78±0,01
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	461±22	5,11±0,10	1,02±0,02	0,51±0,02
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	437±21 (-5%)	5,12±0,09 (+0,1%)	1,08±0,01 (+5%)	0,50±0,02 (-2%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	677±23* ¹ (+47%)	7,23±0,11* ¹ (+41%)	2,88±0,02* ¹ (+182%)	0,96±0,02* ¹ (+88%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Дослідження стінки судин судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок центральної мозкової і очної артерій (далі по тексту: судин головного мозку) показало, що щільність ядер ендотеліоцитів тут на рівень перевищує аналогічний показник капілярної мережі кори головного мозку. В результаті 30-добової хронічної насильницької алкогольної інтоксикації до 45-ї доби експерименту спостерігається зниження щільності ядер ендотеліоцитів судин м'язового типу на 35,7% на одиницю площі стінки судин у порівнянні з інтактними тваринами, що свідчить про пошкодження цього типу судин і формування ендотеліальної дисфункції (табл. 4.15).

Таблиця 4.15

**Вплив Ангіоліну і Мілдронату на морфофункціональну
характеристику ендотеліоцитів стінки судин головного мозку щурів з 30-
денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням**

Експериментальні групи	Щільність ядер на 1 мм ² стінки судин	Площа ядер, мкм ²	Діаметр ядер, мкм ²	Концентрація РНК в ядрах, E _{оп}
Інтакт (n=10)	14168±553	7,04±0,26	2,94±0,05	0,294±0,003
Контроль (хронічна алкоголізація)(n=10)	9113±311	6,07±0,17	2,07±0,04	0,211±0,001
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	9883±322 (+8%)	6,13±0,11 (+1%)	2,91±0,03 (+40%)	0,207±0,001 (-2%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	12983±221* ¹ (+42%)	7,38±0,21* ¹ (+22%)	2,95±0,02* ¹ (+42%)	0,293±0,001* ¹ (+41%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату

На ці ж терміни спостереження реєстрували зниження пулу РНК в ядрах ендотеліоцитів стінки судин на 28,3% (таблиця 4.15). Введення протягом 15 діб Ангіоліну після хронічної алкогольної інтоксикації надавало протективний ефект на ендотелій судин м'язового типу, що проявлялося достовірним збільшенням щільності ядер ендотеліоцитів (42%) на одиницю площі зрізу кори, площі ядер (22%), діаметра ядер (42%) і підвищенням в них концентрації РНК на 41%.

Зазначене вище може свідчити про відновлення судин головного мозку тварин з хронічною алкоголізацією і підтверджує ендотеліопротективну дію Ангіоліну, яка призводить до ревазуляризації і компенсації потужності кровопостачання кори головного мозку. Призначення тваринам після

хронічної алкоголізації референс-препарату «Мілдронат» в дозі 250 мг/кг не проявляло протективної дії щодо ендотелію судин кори мозку.

При вивченні ступеня зв'язування фактора росту ендотелію судин (VEGF) і характеру проліферативної активності ендотелію судин головного мозку за 15 днів встановлено, що хронічна 30-добова алкогольна інтоксикація призводила до зниження зв'язування VEGF з ендотелієм судин мозку на 47% в порівнянні з аналогічним показником групи інтакту. Курсове 15-добове призначення Ангіоліну після 30-добової алкоголізації призводило до підвищення зв'язування VEGF з ендотелієм судин мозку в 3,67 рази (таблиця 4.16). Введення Мілдронату аналогічним курсом в дозі 250 мг / кг не впливало на процес зв'язування VEGF з ендотелієм судин мозку. Хронічна 30-добова алкоголізація пригнічувала проліферативну активність судинного ендотелію судин мозку на 45 добу експерименту, про що свідчило зменшення щільності проліферуючих клітин до 30-ї доби на 75,3% (табл. 4.16).

Курсове 15 добове призначення Ангіоліну в дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково щурам з хронічною алкогольною інтоксикацією достовірно підвищувало щільність проліферуючих ендотеліоцитів стінок судин головного мозку на 142%.

Призначення Ангіоліну призводило до підвищення показників проліферації ендотеліоцитів судин мозку – площа ядер – на 149% і діаметр ядер – на 46% (табл. 4.16). Отримані дані свідчать про те, що препарат «Ангіолін» проявляє ендотеліопротективну активність в умовах хронічної алкогольної інтоксикації, молекулярний механізм якої пов'язаний з експресією васкулоендотеліального фактора (VEGF) і впливом на проліферативну активність ендотелію в церебральних судинах м'язового типу [169, 326].

Таблиця 4.16

Вплив Ангіоліну і Мілдронату на морфо-функціональну характеристику проліферуючих ендотеліоцитів судин головного мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією і подальшим 14-денним лікуванням

Експериментальні групи	Щільність проліферуючих клітин на 1 мм ² кори	Площа ядер, мкм ²	Діаметр ядер, мкм ²	Концентрація фактору росту ендотелію (VEGF), E _{iФ}
Інтакт (n=10)	8430±893	14,78±0,86	3,82±0,12	1,34±0,08
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	2077±210	5,92±0,33	2,59±0,1	0,71±0,02
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	2081±188 (+0,1%)	6,00±0,27 (+1%)	2,77±0,1 (+7%)	0,62±0,01 (-12%)
Ангіолін, 100мг/кг (n=10)	5037±227* ¹ (+142%)	14,75±0,52* ¹ (+149%)	3,78±0,05* ¹ (+46%)	3,32±0,44 * ¹ (+367%)

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Таким чином, призначення Ангіоліну тваринам після хронічної алкогольної інтоксикації призводить до вираженої ендотеліопротекції - збереженню ендотеліоцитів, підвищенню їх проліферативної активності в судинах головного мозку і капілярної мережі кори, збільшує індекс їх проліферації як за рахунок впливу на ендотеліальний фактор росту (VEGF), так і, можливо, за рахунок самостійної дії на ендотелій.

4.2. Експериментальне вивчення нейропротективних властивостей таблеток «Ангіолін» в умовах моделювання 30-денної хронічної алкогольної інтоксикації і одночасного введення препаратів

4.2.1. Вплив профілактичного введення Ангіоліну на неврологічний статус і когнітивно-мнестичні функції тварин при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації

Оцінку функціонального стану вищої нервової діяльності проводили щодня з моменту початку хронічної насильницької алкогольної інтоксикації тварин і одночасно здійснюваного профілактичного лікування за шкалою Stroke-index за наступними показниками: спонтанна рухова активність (нормальна, підвищена або знижена, відсутність), розлади ходи (скутість, хиткість, сповільненість рухів, порушення орієнтації), рефлексі відсмикування хвоста, обох передніх і задніх лап, реакція на звук, тремор, судоми, тонус м'язів тулуба і кінцівок (нормальний, підвищений, відсутність), ознаки птозу (відсутність, односторонній, двосторонній). Кожен показник оцінювали в балах: 0 балів – норма; 1 бал – помірно виражені зміни; 2 бали – різко виражені зміни.

З моменту початку хронічної алкоголізації в групі контролю відзначається поступове наростання неврологічної симптоматики у вигляді тремору, тривожності, конфліктності, агресивності, гіперактивності, в подальшому млявості і дискоординації рухів, апатії, пасивного перебування тварин в лежачому стані, тонічних і клонічних судом, птозу. Внутрішньошлункове профілактичне введення таблеток «Ангіолін» в дозі 100 мг/кг протягом 30 діб щурам з хронічною алкогольною інтоксикацією призводило до підвищення виживаності тварин, зменшення середнього балу неврологічного дефіциту, зростанню числа тварин з середнім і легким ступенем неврологічного дефіциту і зниження числа тварин з важким

ступенем неврологічного дефіциту. Також позитивна динаміка відзначалася і в групах, які отримували Мілдронат (250 мг/кг) (табл. 4.17).

Таблиця 4.17

**Оцінка неврологічного дефіциту тварин з 30-денною хронічною
алкоголізацією і одночасно проведеним лікуванням згідно шкали С.Р.
McGraw подовово в балах**

Групи тварин (по 10 щурів кожна група)	1 доба	5 доба	10 доба	15 доба	20 доба	25 доба	30 доба
Ангіолін,100 мг/кг (n=20)	0	1,27± 0,1* (-63%)	2,2± 0,1* (-53%)	2,3± 0,1* (-58%)	2,75± 0,2* (-55%)	2,8± 0,2* (-59%)	2,8± 0,2* ¹ (-61%)
Мілдронат,250 мг/кг (n=20)	0	3,0± 0,4 (-14%)	3,7± 0,52 (-21%)	3,8± 0,46 (-31%)	3,7± 0,31* (-40%)	4,0± 0,23* (-42%)	4,4± 0,31* (-39%)
Контроль (ХАІ) (n=20)	0	3,5±0,38	4,7± 0,44	5,5± 0,42	6,2± 0,77	6,9± 0,54	7,3± 0,53
Інтакт (n=20)	0	0	0	0	0	0	0

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

На 5 день проведення алкоголізації тварин і одночасного профілактичного лікування в групі, що отримувала Мілдронат, не було виявлено відмінностей у вираженості в балах неврологічних порушень по відношенню до групи контролю. У групі тварин, які отримували Ангіолін, була зареєстрована менш виражена в порівнянні з контролем неврологічна симптоматика (на 2,23 бали).

На 10 день експерименту неврологічна симптоматика в групі контролю зросла відносно інтактною на 4,7 бали. Профілактичне введення Мілдронату

протягом 10 діб не робило достовірного впливу на цей показник, а введення Ангіоліну протягом цього терміну призводило до достовірного зниження неврологічного дефіциту на 2,5 бали щодо контролю. На 15 добу споживання алкоголю в групі контролю спостерігали посилення неврологічних порушень на 5,5 балів, введення Мілдронату не мало достовірного впливу на неврологічну симптоматику експериментальних тварин. Введення протягом 15 діб Ангіоліну призводило до достовірного зниження цього показника на 2,2 бали ($p \leq 0,05$). З 20 дня експерименту зафіксовано достовірне зниження неврологічного дефіциту в групі тварин, які отримували Мілдронат (на 2,7 бали) [132]. Введення протягом 20 діб Ангіоліну знижувало цей показник на 3,45 бали ($p \leq 0,05$).

На 25 день експерименту, що проводився, неврологічний дефіцит в групі алкоголізованих тварин зріс на 6,9 балів у порівнянні з інтактом, а введення протягом 25 днів Мілдронату й Ангіоліну достовірно знизило неврологічні порушення у тварин на 2,9 і 4,1 балів відповідно.

На останній, 30 день експерименту, в групі контролю був зареєстрований максимально виражений за весь період спостереження неврологічний дефіцит у тварин, які отримували алкоголь (7,3 бали). Введення протягом 30-діб Мілдронату і Ангіоліну знижувало вираженість неврологічних порушень у алкоголізованих тварин на 2,9 ($p \leq 0,05$) і 4,5 ($p \leq 0,05$) балів відповідно. 30-добове введення Ангіоліну надавало достовірно більш виражений вплив щодо зниження неврологічних порушень, ніж аналогічне за тривалістю введення Мілдронату [132]. На підставі цих даних можна зробити висновок, що з 5 доби введення Ангіолін ефективно впливав на неврологічний статус тварин, які показали мінімальні прояви неврологічної симптоматики, що максимально наближалось до групи інтакту. Менш ефективним був Мілдронат, який проявляв достовірно позитивний вплив на неврологічний статус тільки після 20 діб введення.

Для оцінки орієнтовно-дослідницької активності тварин проводився тест «відкрите поле» в першу і останню добу експерименту (табл. 4.18).

Таблиця 4.18

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на орієнтовно-дослідницьку активність тварин (протягом 5 хв.) з 30-денною хронічною алкоголізацією

Групи тварин	Кількість горизонтальних рухів	Кількість вертикальних рухів	Грумінг	Дослідження отворів	Дефекація
Інтакт (n=20)	58,3±5,56	19,4±1,91	3,1±0,75	10,2±2,35	1,9±0,6
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=20)	11,7±1,55	4,8±0,81	1,3±0,47	1,6±0,59	1,0±0,3
Мілдронат, 250 мг/кг (n=20)	34,5±5,29* (+194%)	11,7±1,83* (+144%)	1,4±0,68 (+7%)	2,8±1,56 (+75%)	1,15±0,3 (+15%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=20)	52,3±5,81* ¹ (+347%)	19,4±1,84* (+304%)	2,7±0,78* (+107%)	7,5±1,91* ¹ (+368%)	1,55±0,6 (+55%)

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

У перший день експерименту значних відмінностей у всіх групах тварин по всіх досліджуваних показниках не спостерігалось.

На 30 добу хронічної алкоголізації і одночасно проведеної профілактичної терапії було відзначено, що горизонтальна рухова активність в групі Ангіоліну збільшилася на 347%, Мілдронату – на 194% по відношенню до контролю; вертикальна рухова активність в групі Ангіоліну збільшилася на 304%, Мілдронату – на 144% по відношенню до контролю; акти грумінга в групі Ангіоліну збільшилися на 107%, Мілдронату – на 7% по відношенню до контролю; кількість обстежень отворів в групі Ангіоліну збільшилася на 368%, Мілдронату – на 75% по відношенню до контролю; дефекація в групі Ангіоліну збільшилася на 55% по відношенню до контролю, а в групі Мілдронату – збільшилася на 15%.

За всіма вищеописаними показниками однозначно лідирує Ангіолін, який при введенні в профілактичному режимі максимально відновлював орієнтовно-пошукову активність алкоголізованих тварин.

Також в останній день експерименту у алкоголізованих тварин проводився тест збереження умовного рефлексу (умовна реакція пасивного уникнення) (табл. 4.19).

Таблиця 4.19

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на збереження умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) у щурів з 30 денною алкогольною інтоксикацією

Групи тварин (по 10 щурів кожна група)	Латентний період в тесті УРПУ до навчання, сек	Латентний період в тесті УРПУ через 24 години після навчання, сек	Кількість тварин, що навчаються, %
Інтакт (n=10)	14,1±2,6	181,4±11,2	100
Контроль (хронічна алкоголізація) (n=10)	5,57±0,94	7,65±2,34	10
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	8,11±0,95 (+45%)	34,7±4,55 (+353%)	10
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	5,78±0,87 (+3,7%)	78,7±9,5*. ¹ (+928%)	60

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

З наведених у таблиці даних однозначно випливає висновок про те, що тільки Ангіолін зберігав процеси формування пам'ятного сліду у алкоголізованих тварин. Латентний період заходу в темний відсік у щурів з групи, що одержувала Ангіолін, значно збільшувався, практично наближаючись до показника групи інтакту. Профілактичне введення Мілдронату не робило будь-якого помітного впливу на цей показник когнітивно-пізнавальної функції ЦНС.

4.2.2. Вплив профілактичного введення Ангіоліну на показники оксидативного і нітрозативного стресу в головному мозку при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації

При моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації і одночасного проведення профілактичного лікування протягом 30 діб нами були отримані наступні показники нітрозативного стресу в головному мозку щурів [231].

Аналогічно першому досвіду було відмічено підвищення показників альдегідфенілгідрозонів (АФГ) і кетонфенілгідрозонів (КФГ), а також продуктів нітрозолування білків - нітротирозину в головному мозку і плазмі крові у всіх групах тварин по відношенню до інтакту (табл. 4.20).

Таблиця 4.20

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на рівень маркерів оксидативного стресу в головному мозку тварин при моделюванні хронічної алкоголізації і одночасного лікування протягом 30 діб

Група тварин	Продукти ОМБ, у.о./г білка		Нітротирозин, нмоль/г білка
	АФГ, мкмоль/л	КФГ, мкмоль/л	
Інтакт (n=10)	0,268±0,029	0,172±0,021	17,3±01,34
Контроль (ХАІ) (n=10)	0,519±0,068	0,338±0,028	157,9±11,2
Мілдронат, 250 мг/кг(n=10)	0,375±0,06* (-27%)	0,310±0,048 (-8%)	83,4±5,23* (-47%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	0,278±0,03* ¹ (-46%)	0,192±0,023* ¹ (-43%)	42,7±3,65* ¹ (-73%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Так, вміст первинного продукту окислювальної модифікації білків (ОМБ) – АФГ знизився на 46% в групі Ангіоліну і на 27% – в групі Мілдронату по відношенню до контролю. Кінцевий маркер ОМБ КФГ

знизився на 43% в групі Ангіоліну і на 8% - в групі Мілдронату по відношенню до контролю. Також відзначено зниження показників нітротирозину в головному мозку щурів на фоні проведеного одночасно з алкоголізацією лікування на 73% в групі Ангіоліну і на 47% – в групі Мілдронату по відношенню до контролю.

Також було виявлено зміну показників системи оксиду азоту в гомогенаті мозку в умовах 30-добової алкоголізації і на фоні профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату. Проведений одночасно з алкоголізацією курс лікування привів до того, що рівень стабільних метаболітів NO і NO-синтази знизився відповідно в групі Ангіоліну на 67% і 68%, а Мілдронату на 21% і 28% по відношенню до групи контролю [289]. У той же час відмічено підвищення вмісту L-аргініну, а також активності ферментів антиоксидантного захисту нейрона – каталази і СОД, відповідальних за регуляцію біодоступності NO [31, 38, 103, 309]. Так, в групі Ангіоліну спостерігали підвищення L-аргініну, СОД і каталази на 101%, 168% і 271% відповідно. У головному мозку щурів з ХАІ, які отримували профілактично Мілдронат, рівень L-аргініну залишався аналогічним групі контролю, а активність СОД зросла 27%, а каталази - на 72% (табл. 4.21) [247].

Таблиця 4.21

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на показники системи оксиду азоту в головному мозку щурів на фоні 30-денної хронічної алкогольної інтоксикації

Групи тварин	Стабільні метаболіти NO, мкМ/г	NO-синтаза, нмоль/мг білка/хв	L-аргінін, мкмоль/ г тканини	Каталаза, мкат/мг білка	СОД, у.о./мг білка/ хв
1	2	3	4	5	6
Інтакт (n=10)	5,19±0,13	2,53±0,16	3,68±0,31	8,26±0,23	270,8±18,1
Контроль (ХАІ) (n=10)	14,4±0,26	7,31±0,42	1,77±0,12	2,84±0,30	106,1±7,73

Продовження таблиці 4.21

1	2	3	4	5	6
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	11,3±0,48* (-21%)	5,28±0,42* (-28%)	1,74±0,21 (-2%)	4,87± 0,11* (+72%)	134,7 ±14,5* (+27%)
Ангіолін,100 мг/кг (n=10)	4,65±0,32* ¹ (-67%)	2,34±0,25* ¹ (-68%)	3,55±0,23* ¹ (+101%)	10,67± 0,37* ¹ (+271%)	285,3 ±15,7* ¹ (+168%)

Примітка:* – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

4.2.3. Вплив профілактичного введення Ангіоліну на показники енергетичного метаболізму в головному мозку при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації

Яскраво виражені зміни енергетичного метаболізму були виявлені в групі контролю, які проявилися в кількісному підвищенні такого показника, як лактат, і зниженні малату і пірувату, що відобразило закономірно виникаючий енергодефіцит в тканинах мозку при формуванні хронічної алкогольної інтоксикації (табл. 4.22, 4.23). Гостра або хронічна алкогольна інтоксикація обумовлює цілий каскад патобіохімічних реакцій, які в кінцевому підсумку призводять до розвитку осередкового неврологічного дефіциту, дисциркуляторної енцефалопатії або до загибелі хворого [33, 63]. Тісний взаємозв'язок порушень енергетичного та пластичного обміну, їх вплив на перебіг і прогноз захворювання нерідко не враховуються при розробці схем лікування, а основою патогенетичної терапії вважається відновлення гемодинаміки. Останнім часом порушенням енергетичного метаболізму і можливостям його корекції приділяється велика увага [25].

Таблиця 4.22

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на показники енергетичного метаболізму в головному мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією

Групи тварин	Лактат, мкмоль/г тканини	Малат, мкмоль/г тканини	Піруват, мкмоль/г тканини
Інтакт (n=10)	2,40±0,09	0,48±0,03	0,85±0,04
Контроль (ХАІ) (n=10)	4,78±0,91	0,39±0,05	0,63±0,05
Мілдронат, 250 мг/кг(n=10)	4,87±0,55 (+2%)	0,42±0,08 (+8%)	0,71±0,06 (+13%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	2,42±0,18* ¹ (-49%)	0,71±0,05* (+82%)	0,83±0,07* (+31%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Так, нами було встановлено, що ХАІ призводить до енергодефіциту на фоні гальмування реакцій циклу Кребса і активації анаеробного гліколізу і формування лактат-ацидозу. На ранніх етапах ішемії клітинний ацидоз можна розглядати як захисну реакцію, так як зниження рН надає стабілізуючу дію на клітинні мембрани. Однак прогресування ацидозу викликає денатурацію деяких білків і формування в цитоплазмі зерен, що проявляється в появі помутніння цитоплазми («мутне набухання», «зерниста дистрофія»). Посилене звільнення лактату при гіпоксії дає метаболічний лактатацидоз, який блокує активність генів, що лімітує адаптацію. На цій стадії гіпоксії в клітці формується справжній дефіцит АТФ, оскільки аеробний механізм не працює через кисневий дефіцит, а анаеробний – через ацидоз [39]. У зв'язку з цим, стійкість до гіпоксії формується за рахунок

перебудови енергетичних шляхів, яка передбачає мобілізацію механізмів подачі протонів для окисного фосфорилування і економного використання відсутнього кисню. При профілактичному призначенні Ангіоліну на фоні одночасної 30-денної алкогольної інтоксикації відбувалося зниження рівня лактату на 49% по відношенню до групи нелікованих тварин ($p \leq 0,05$) при паралельному наростанні рівня малату – на 82% і пірувату – на 31%, що також свідчить про нормалізацію циклу трикарбонових кислот і обмеження активності анаеробного гліколізу.

Профілактичне призначення Мілдронату не робило достовірного впливу на показники енергетичного обміну головного мозку [64]. Подібна картина спостерігається і при визначенні динаміки зміни макроергічних фосфатів на фоні хронічної алкогольної інтоксикації у щурів з одночасним проведенням профілактичного лікування протягом 30 днів. У групі контролю відзначено різке зниження вмісту АТФ і АДФ в мозку тварин з одночасним підвищенням вмісту АМФ (табл. 4.23).

Таблиця 4.23

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на показники аденілових нуклеотидів в головному мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією

Групи тварин	АТФ, мкмоль/г тканини	АДФ, мкмоль/г тканини	АМФ, мкмоль/г тканини
Інтакт (n=10)	3,16±0,17	0,45±0,06	0,16±0,02
Контроль (ХАІ) (n=10)	1,57 ±0,15	0,37±0,07	0,23±0,02
Мілдронат, 250 мг/кг(n=10)	1,77±0,07 (+13%)	0,37±0,05 (0%)	0,24±0,01 (+4%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	3,10±0,11* ¹ (+97%)	0,44±0,05 (+19%)	0,15±0,01* ¹ (-35%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Призначення досліджуваних препаратів одночасно з 30-денною алкоголізацією показало, що Ангіолін збільшував рівень АТФ на 97%, АДФ – на 19% при зниженні рівня АМФ на 35%. Застосування Мілдронату не призводить до значного підвищення енергопродукції в головному мозку тварин з ХАІ [247].

Також вивчалися показники ГАМК-шунта, які тісно взаємопов'язані з енергодефіцитом, що виникає при хронічній алкогольній інтоксикації. Зміну стану ГАМК-ергічної системи розцінюють як компенсаторну активацію додаткового шунта утворення енергії в умовах гальмування циклу Кребса. Так, гальмування окислення α -кетоглутарату призводить до активації ГДК і перетворенню глутамату в ГАМК, а потім при активації ГАМК-Т – в бурштиновий напівальдегід, який, перетворюючись в сукцинат, окислюється в циклі Кребса [35, 55, 69].

У групі контролю було відзначено зменшення кількості ГАМК, гліцину, глутамату і одночасне підвищення рівня ГДК і ГАМК-Т, що свідчить про те, що компенсаторна активація додаткового шунта утворення енергії не відбулася (табл. 4.24).

Таблиця 4.24

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на показники системи гальмівних нейромедіаторів в головному мозку щурів з 30-денною алкогольною інтоксикацією

Групи тварин	ГАМК, мкм/г тканини	Глутамат, мкм/г тканини	Гліцин, мкм/г тканини	ГДК, мкм/мг білка/хв	ГАМК-Т, мкм/мг білка/хв
1	2	3	4	5	6
Інтакт (n=10)	2,88±0,21	15,2±1,21	3,88±0,41	12,87±1,10	12,5±1,17
Контроль (ХАІ) (n=10)	1,12±0,10	7,00±0,67	2,21±0,18	17,12±1,22	21,1±2,65
Мілдронат,250 мг/кг(n=10)	1,22±0,14 (+9%)	8,12±0,72 (+16%)	2,47±0,34 (+12%)	18,21±1,34 (+6%)	22,4±3,16 (+6%)

Продовження таблиці 4.24

1	2	3	4	5	6
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	2,45±0,22* (+119%)	10,5±0,87* (+50%)	3,43± 0,21* ¹ (+55%)	14,76± 1,55* (-13%)	14,2±1,47* ¹ (-32%)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

В результаті проведеного курсу лікування група Мілдронату показала підвищення рівнів ГАМК, глутамату і гліцину на 9%, 16% і 12% відповідно по відношенню до контролю і підвищення ГДК і ГАМК-Т на 6% і 6% відповідно по відношенню до контролю. У групі Ангіоліну відзначається підвищення рівнів ГАМК, глутамату і гліцину на 119%, 50% і 55% відповідно по відношенню до контролю, і зниження активності ГДК і ГАМК-Т на 13% і 32% відповідно по відношенню до контролю. Таким чином, профілактичне введення Ангіоліну надавало нормалізуючий вплив на вміст гальмівних і збуджуючих амінокислот в головному мозку щурів з хронічною алкоголізацією [64].

4.3. Вплив профілактичного введення Ангіоліну на морфометричні показники СА-1 зони гіпокампу і процеси апоптозу при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації

При проведенні морфологічних досліджень нейронів зони СА-1 гіпокампу головного мозку щурів встановлено, що при хронічній алкогольній інтоксикації на фоні інтенсифікації реакцій нітрозуючого і оксидативного стресів, розвитку енергодефіциту в тканинах головного мозку змінюється морфо-функціональний стан нейронів [47, 242, 247]. Дані зміни виражаються в достовірному зниженні щільності нейронів в групі контролю до $897,0 \pm$

69,9 нейронів/мм² в порівнянні з інтактними тваринами, у яких даний показник становив $1443,2 \pm 32,9$ нейронів/мм² (табл. 4.25).

Таблиця 4.25

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на щільність нейронів, площі тіл нейронів, вміст РНК в зоні СА-1 гіпокампу щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією і одночасним лікуванням

Досліджувані показники	Щільність нейронів (нейрон/мм ²)	Площа нейронів (мкм ²)	Вміст РНК (E _{оп})
Інтакт (n=10)	1443,2±32,9	163,6±9,2	14,8±0,76
Контроль (ХАІ) (n=10)	897,0±69,9	110,3±8,63	9,4±0,99
Мілдронат, 250 мг/кг(n=10)	1082,3±88,9* (+21%)	120,0±6,3 (+9%)	9,5±0,64 (+1%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	1411,1±61,0* ¹ (+57%)	160,1±10,8* ¹ (+45%)	16,7±0,97* ¹ (+77%)

Примітка:* – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Експериментальна терапія тварин з введенням Ангіоліну і Мілдронату паралельно алкоголізації демонструвала ефект нейропротективної дії збільшенням щільності нейронів на 57% і 21% відповідно по відношенню до контрольної групи тварин.

Також Ангіолін і Мілдронат збільшували площу нейронів в зоні СА-1 гіпокампу щурів на 45% і 9% відповідно по відношенню до контролю і вміст РНК на 77% і 1,0% відповідно по відношенню до контролю [46].

При вивченні гліальних клітин нами було відзначено зменшення щільності гліальних клітин в групі контролю до $317,9 \pm 8,25$ клітин на мм², в той час, як цей же показник у групи інтакту склав $451,7 \pm 16,5$ клітин на мм² (табл. 4.26).

Таблиця 4.26

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на щільність і площу глії, вміст РНК в зоні СА-1 гіпокампу щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією

Досліджувані показники	Щільність гліальних клітин (нейрон/мм ²)	Площа гліальних клітин (мкм ²)	Вміст РНК (E _{оп})
Інтакт (n=10)	451,7±16,5	25,7±1,18	6,7±0,54
Контроль (ХАІ) (n=10)	317,9±8,25	18,8±0,82	3,7±0,58
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	321,6±11,5 (+1%)	22,8±0,71* (+21,2%)	4,6±0,44* (+24%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	458,0±12,6* ¹ (+232%)	25,8±1,95* (+37%)	6,91±0,27* ¹ (+86%)

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Після проведення курсу експериментальної терапії одночасно з алкоголізацією виявлено позитивний ефект – Ангіолін й Мілдронат збільшували щільність гліальних клітин на 232% і 1,0% відповідно по відношенню до контрольної групи. Відзначено також зменшення площі гліальних клітин в контрольній групі до $18,8 \pm 0,82$ мкм², в той час як в групі інтакту цей показник склав $25,7 \pm 1,18$ мкм². Ангіолін і Мілдронат збільшили даний показник на 37% і 21,2% відповідно по відношенню до контролю. Також дані препарати надали позитивний вплив на вміст РНК в гліальних клітинах, підвищивши цей показник (на 86% – Ангіолін і на 24% – Мілдронат) по відношенню до контролю [247].

Щільність апоптотичних клітин контрольної групи досягла показника $167,1 \pm 12,7$ на 1 мм², в той час як в групі інтакту щільність апоптотичних клітин склала $78,2 \pm 12,5$ на 1 мм² (табл. 4.27).

Таблиця 4.27

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на щільність апоптичних і деструктивно змінених клітин в зоні СА-1 гіпокампу головного мозку щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією

Досліджувані показники	Щільність апоптотичних клітин на 1 мм ²	Доля апоптичних клітин, %
Інтакт (n=10)	78,2±12,5	4,28±0,75
Контроль (ХАІ) (n=10)	167,1±12,7	16,1±1,18
Мілдронат, 250 мг/кг(n=10)	142,2±10,9 (-15%)	12,1±1,16 (-24,8%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	81,2±5,1* ¹ (-51%)	5,02±0,33* ¹ (-68,8%)

*Примітка:** – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

У групі Ангіоліну щільність апоптотичних клітин зменшилася на 51%, в групі Мілдронату – на 15% по відношенню до контролю. Відповідно досліджувані препарати зменшували частку апоптотичних клітин (на 68,8% Ангіолін, на 24,8 % – Мілдронат) по відношенню до групи контролю.

На рисунку 4.3 представлені фотографії нейронів СА-1 зони гіпокампу щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією і одночасно проведеним лікуванням.

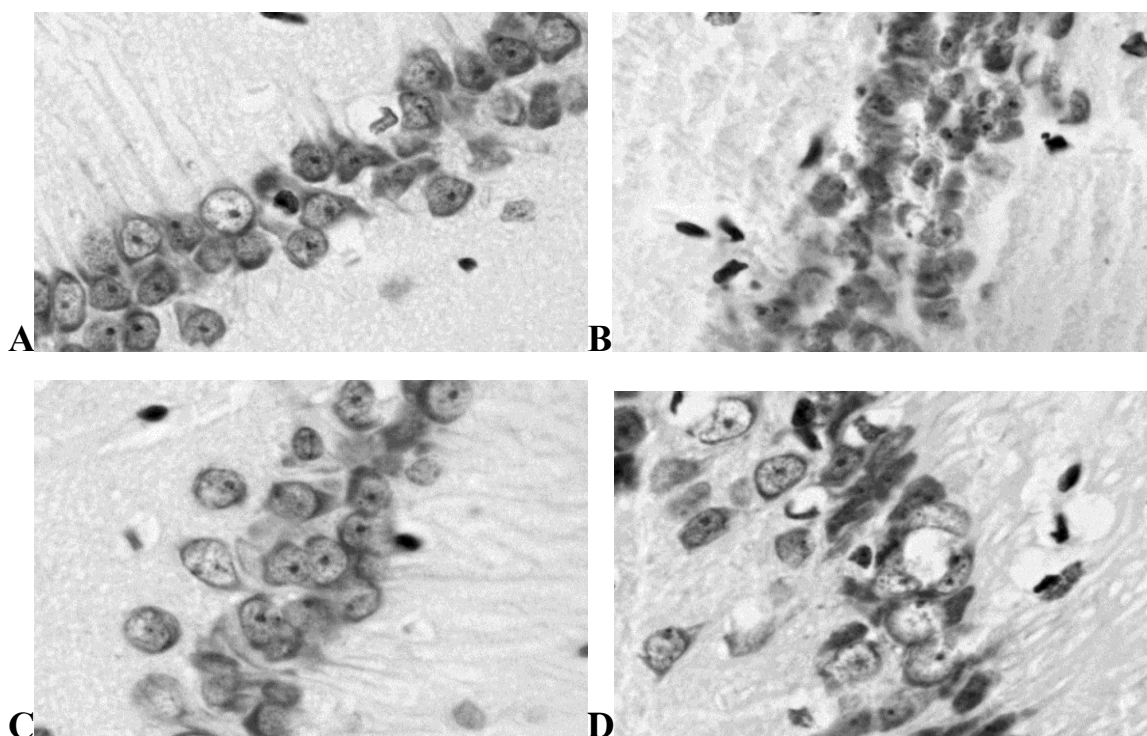


Рисунок 4.3. Картина нейродегенерації після 30-денної алкогольної інтоксикації і одночасного профілактичного внутрішньошлункового введення Ангіоліну і Мілдронату (застосовувалося забарвлення галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсеном, збільшення x40)

A - СА1 зона гіпокампу у тварин групи інтакту;

B - СА1 зона гіпокампу у тварин контрольної групи;

C - СА1 зона гіпокампу у тварин групи Ангіоліну (100 мг/кг);

D - СА1 зона гіпокампу у тварин групи Мілдронату (250 мг/кг).

Також була визначена експресія антиапоптотичного білка Bcl-2 у всіх досліджуваних групах в гомогенаті мозку щурів (табл. 4.28).

Таблиця 4.28

Вплив профілактичного введення Ангіоліну і Мілдронату на експресію антиапоптотичного білка Bcl-2 в головному мозку щурів з хронічною 30-денною алкоголізацією

Група тварин	Площа забарвленої плями, мм ²	Оптична концентрація білка Bcl-2, умовні од. оптич. щільн.	Оптичний вміст білка Bcl-2, умовні од. оптич. щільн.
1	2	3	4
Інтакт (n=10)	62,11	0,15±0,02	6,26±0,77

Продовження таблиці 4.28

1	2	3	4
Контроль (ХАІ) (n=10)	57,12	0,02±0,01	1,32±0,11
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	58,33	0,04±0,02* (+100%)	2,75±0,21* (+108%)
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	63,04	0,12±0,02* ¹ (+500%)	5,43±0,47* ¹ (+311%)

Примітка:* – $p \leq 0,05$ відносно контролю;

¹ – $p \leq 0,05$ відносно Мілдронату.

Відзначено підвищення експресії білка Bcl-2 в групах тварин, які отримували нейропротективну терапію і зниження експресії білку Bcl-2 в контрольній групі, що отримувала тільки етанол.

Сімейство клітинних білків Bcl-2 налічує 17 членів. Білки сімейства Bcl-2 виявляють широкий спектр активності від пригнічення апоптозу до його індукції. Сімейство включає в себе субсімейства, що розрізняються функціонально і структурно: субсімейство найбільш близьких гомологів Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w і ін.) – інгібіторів апоптозу; білки субсімейств Bax і BH3, що промотують апоптоз [46, 144]. Апоптоз асоціюється з різними змінами в мітохондріях, включаючи вивільнення цитохрому С в цитоплазму. Bcl-2-споріднені білки включені в регуляцію цих змін шляхом формування каналів у мембрані, через які цитохром С надходить у цитоплазму [330]. При цьому Bcl-2 і Bcl-XL інгібують викид цитохрому С, а Bax - стимулює. Однак Bcl-2 може пригнічувати здатність Bax формувати канали. Крім того, Bcl-2 і Bcl-XL можуть зв'язувати цитохром С безпосередньо і витіснити його з апоптосоми, запобігаючи цим активації каспаз.

Виходячи з отриманих нами результатів, простежується позитивний вплив Ангіоліну на площу, щільність і вміст РНК як нейронів, так і гліальних

клітин. Ангіолін викликає яскраво виражений гліюцитоз, а збільшення вмісту РНК в клітинах глії свідчить про підвищення функціональної активності клітин, активації генів і синтезу білка. Гліюцитоз є компенсаторним механізмом, який запускається при пошкодженні нервової тканини[35]. Також необхідно відзначити, що терапія досліджуваними препаратами призвела до значного зменшення процесів апоптозу, про що свідчило зменшення щільності і частки апоптотичних клітин. Опираючись на отримані результати, можна стверджувати, що Ангіолін є ефективним нейропротектором, який захищає нейрони від токсичного впливу етанолу та його метаболітів. Це узгоджується з нашими попередніми дослідженнями, де було доведено, що Ангіолін здатний підсилювати компенсаторну активацію аеробного гліколізу, знижує ступінь пригнічення окисних процесів в циклі Кребса, зберігає завдяки цьому внутрішньоклітинний фонд АТФ, стабілізує мембрани нейронів [19].

Результати проведених дослідів дозволяють зробити наступні висновки:

1. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг / кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації призводило до зменшення оксидативного і нітрозативного стресу – АФГ на 32% і КФГ на 36%, стабільних метаболітів NO на 54% і активності NO-синтази на 59%, нітротирозину на 82% на фоні підвищення активності СОД на 160%, каталази на 248%.

2. Призначення Ангіоліну знижувало розвиток неврологічного та когнітивного дефіциту у тварин - призводило до поліпшення показників орієнтовно-дослідницької діяльності на 151-321 %, збільшення латентного періоду УРПУ на 134 %, зменшення прояву неврологічної симптоматики (на 3 бали за McGrow).

3. Курсове призначення Ангіоліну в лікувальному і профілактичному режимах введення тваринам з хронічною алкогольною інтоксикацією

зменшувало ступінь вираженості енергодефіциту за рахунок інтенсифікації окислювальної продукції АТФ, посилюючи активність дикарбонової ділянки циклу Кребса; знижувало «витрачання» інтермедіатів ГАМК-шунта в енергообміні, підвищувало концентрацію гальмівних амінокислот; знижувало активність анаеробного гліколізу і розвиток лактат-ацидозу в головному мозку алкоголізованих тварин.

4. Нейропротективна дія Ангіоліну підтвердилася і при морфологічних дослідженнях нейронів зони СА-1 гіпокампу тварин, які перенесли хронічну алкогольну інтоксикацію. Введення Ангіоліну призводило до збільшення щільності нейронів СА-1 зони гіпокампу на 49,3%, зменшення щільності апоптично змінених нейронів на 38%, підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2 на 460%.

5. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації призводило до підвищення щільності ендотеліоцитів капілярної мережі кори головного мозку на 38% і судинної стінки судин мозку на 42%, підвищувало вміст РНК в ендотеліоцитах на 37% і 41% відповідно, а також збільшувало щільність проліферуючих ендотеліоцитів в цих судинах на 47% і 142% відповідно, а також призводило до підвищення експресії фактору росту ендотелію (VEGF) в капілярній сітці і в судинах мозку на 88% і 367% відповідно.

Розділ 5. Аналіз та обговорення отриманих результатів

Високий рівень алкоголізації населення в країнах пострадянського простору і, в тому числі, на Україні є причиною великої кількості гострих отруєнь алкоголем і його сурогатами, що реєструються в останнє десятиліття [191, 241]. В останні роки чітко спостерігається зростання та розповсюдження захворювань, пов'язаних з вживанням алкоголю серед молоді, відзначається неухильне зниження віку прилучення та залежності до спиртних напоїв і збільшення числа підлітків-алкоголіків, а також значне збільшення числа алкогольних отруєнь у дітей, що призводить до зростання смертності [213, 262]. Поряд із значною смертністю при неможливості надання своєчасної медичної допомоги серйозним наслідком гострого отруєння алкоголем є порушення функцій головного мозку, а нейротоксичні пошкодження етанолом істотно впливають на соціальний статус і якість життя цієї категорії хворих, а також є причиною їх інвалідизації [189, 286, 314]. Тому дослідження молекулярно-біохімічних уражень головного мозку при інтоксикації етанолом та розробка нових підходів до таргетної нейропротекції визначає актуальність цього дослідження з можливістю використання отриманих результатів в клінічній практиці [179, 219, 316].

Останнім часом через призму нейропротекції розглядаються препарати, які модулюють активність таких трансмітерних систем головного мозку, як ГАМК-ергічні і глутаматергічні [334, 350]. Відома роль глутаматергічної системи в механізмах глутамат-кальцієвого каскаду, дискоординації в системі NO і ініціації нейроаптозу і втрати когнітивно-мнестичних функцій [51, 298]. На особливу увагу з точки зору нейрофармакології заслуговує L-лізин і його похідні. L-лізин шляхом перетворення в піпеколієву кислоту підвищує афінність ГАМК бензодіазепін-рецепторного комплексу, знижує трансмітерний аутокоідоз і проявляє властивості ендогенного антиконвульсанта, нейропротектора і анксиолітика [19, 40]. Заслуговують на увагу і похідні L-лізину: L-лізину гідрохлорид, L-лізину

есцінат, розроблений в НВО «Фарматрон» (Україна) (S) - 2,6діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) [200, 203] і N⁶- (1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид (селективний інгібітор iNOS) [209], які проявляють нейропротективні властивості на моделях церебральної ішемії й інтрацеребральних крововиливів [178, 221, 326].

Вищевикладене теоретично обґрунтовує перспективність вивчення нейропротективної активності похідних L-лізину в умовах гострої і хронічної алкогольної інтоксикації й визначає актуальність даної роботи. Всі вищевказані досліджувані похідні L-лізину мають, в різного ступеня вираженості і з різним латентним періодом, нейропротективну дію в умовах гострої алкогольної інтоксикації. Захисна дія на головний мозок у похідних L-лізину направлена на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій (тварини швидше реагували на звукові подразники, на взяття їх в руки, переверталися на живіт, починали самостійно пересуватися), а також на зниження оксидативної нейродеструкції [244].

У результаті порівнянь, два похідних L-лізину, а саме Ангіолін і N⁶- (1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид проявили себе більш ефективними за референс препарат. L-лізину есцінат і L-лізину гідрохлорид, за силою проявленої нейропротективної дії проявляють таку ж ефективність, що і Мілдронат [301]. Нейропротективна дія L-лізину есцінату пов'язана не тільки з ефектами L-лізину, але і біофлаваноїдами, виділеними з кінського каштану, що володіють потужними антиоксидантними і протинабряковими властивостями [12, 13]. Механізм дії N⁶- (1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду при гострій алкогольній інтоксикації пов'язаний, на нашу думку, з пригніченням активності iNOS в мозку [228]. Значна роль у механізмах загибелі нейронів при розвитку глутамат-кальцієвого каскаду належить NO-опосередкованим механізмам, пов'язаним з підвищеною активністю iNOS і посиленням утворенням NO, який бере участь у пошкодженні нейронів. Його токсична дія пов'язана з порушенням мітохондріального окисного фосфорилування і метаболізму

рибонуклеотидредуктази, утворенням високотоксичного пероксинітриду, який блокує ряд нейрональних рецепторів, інактивує супероксиддисмутазу і викликає посилення вільно-радикального окислення. Механізм токсичності NO включає також ковалентну модифікацію білків при взаємодії з їх тіоловими групами, а також безпосереднє пошкодження ДНК [330]. Тому в основі нейропротективної дії N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду в умовах гострої алкогольної інтоксикації лежить перш за все його здатність переривати NO-залежні ланки нейродеструкції.

Найбільш активним серед всіх досліджуваних похідних L-лізину є Ангіолін, який проявляє найбільш виражену за дією і найбільш ранню за часом реєстрації достовірну нейропротективну дію. Так, введення 2,5% розчину «Ангіоліну» в лікувальному і, особливо, в профілактичному режимах тваринам з гострою алкогольною інтоксикацією дозволило достовірно зменшити порушення поведінкових і неврологічних показників у різні часові проміжки після прийому субтоксичної дози алкоголю. Так, здійснюючи спостереження за допомогою шкали ІТНП за щурами, які отримали 0,8 ЛД₅₀ етанолу після внутрішньочеревного введення Ангіоліну в різні часові проміжки, було встановлено, що профілактичне введення цього препарату достовірно зменшує індекс тяжкості неврологічних порушень, починаючи з 2 години спостереження. Тварини, які профілактично отримали Ангіолін в дозі 50 мг/кг, через 2 години після прийому великої дози алкоголю відповідали ступеню оглушення (група контролю в стані коми). На цей період спостереження ІТНП тварин, що профілактично отримали Ангіолін, був достовірно на 77% вище за аналогічний показник групи контролю. Також ІТНП тварин, які отримували профілактично Ангіолін, був достовірно вище, ніж ІТНП групи, що профілактично отримували Мілдронат. Ангіолін проявляв достовірну дію відносно ІТНП в порівнянні з Мілдронатом протягом 10 годин спостереження. Саме в цей період після прийому субтоксичних доз алкоголю (гострий період) найбільш часто спостерігається

летальність, що вимагає проведення інтенсивних медикаментозних заходів для порятунку життя пацієнта.

Введення Ангіоліну в лікувальному режимі, після вживання субтоксичної дози алкоголю, призводило до вірогідного зменшення тяжкості неврологічних порушень і підвищення ІТНП, починаючи з 2 години спостереження (підвищення ІТНП на 31%), з максимальним проявом ефекту на 5-й годині спостереження (підвищення ІТНП на 55%). У щурів, які перенесли гостре важке отруєння етанолом, характер динаміки зміни рухової активності не відповідав критеріям «неасоціативне навчання», що говорить про спотворення під впливом етанолу природних процесів збереження і згасання навичок. Одноразове профілактичне введення Ангіоліну на 3 добу збільшувало горизонтальну рухову активність в 3,4 рази, вертикальну – в 2,8 раз і в 3,4 рази дослідницьку активність в порівнянні з групою контролю. Також профілактичне введення Ангіоліну знижувало в 5 разів посталкогольну тривожність тварин. Одноразове введення Ангіоліну в лікувальному режимі збільшувало горизонтальну рухову активність в 2,6 раз, вертикальну – на 90% і в 2,17 раз – дослідницьку активність в порівнянні з групою контролю. Також лікувальне введення Ангіоліну знижувало в 3 рази посталкогольну тривожність тварин. Порівняння показників орієнтовно-дослідницької активності в групах тварин, які отримували Ангіолін як в профілактичному, так і в лікувальному режимах введення з аналогічними показниками інтактної групи не виявив достовірних відмінностей. Таким чином, одноразове введення Ангіоліну в лікувальному і, особливо в профілактичному режимі, нівелювало порушення складних форм поведінки після важкого гострого отруєння етанолом: дослідницьку активність, просторову орієнтацію і рівень мотивації. У щурів, які перенесли гостре важке отруєння етанолом на фоні превентивного або подальшого введення Ангіоліну, характер орієнтовно-рухової активності відповідав критеріям «неасоціативне навчання», що свідчить про високу нейропротективну і ноотропну дію препарату, направлену в тому числі на відновлення

природних процесів збереження і згасання навичок. Таким чином, встановлено, що розчин «Ангіоліну» в лікувальному і, особливо, профілактичному режимі знижують ступінь неврологічних порушень при гострій алкогольній інтоксикації.

Введення Ангіоліну в лікувальному і, особливо в профілактичному режимі, призводило до достовірного зниження АФГ на 32,39%, КФГ на 36,66% і нітротирозину на 67,2% в головному мозку тварин, що перенесли гостре важке отруєння етанолом по відношенню до контролю.

Введення Ангіоліну в лікувальному та в профілактичному режимі призводило до достовірного підвищення щільності нейронів СА1-зони гіпокампу на 45%, збільшення вмісту в них РНК – на 77% і зниження кількості нейронів з ознаками апоптозу на 51%. За силою захисної дії Ангіолін при профілактичному і лікувальному режимі введення тваринам, які перенесли гостре важке отруєння етанолом, достовірно перевершував дію Мілдронату (100 мг/кг), що вводився в аналогічних режимах. Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для поглибленого вивчення нейропротективної дії Ангіоліну при хронічній алкогольній інтоксикації.

Нейропротективний ефект Ангіоліну при гострій алкогольній інтоксикації пов'язаний перш за все з тим, що L-лізин, який входить до його складу, шляхом перетворення в піпеколієву кислоту, підвищує афінність ГАМК бензодіазепін-рецепторного комплексу і знижує трансмітерний аутокоідоз [19, 348]. Також відомо, що L-лізин може перетворюватися і в L-альфа-аміноадіпат, який запобігає гіперзбудженню NMDA-рецепторів нейронів, знижує судомну готовність мозку, гальмує нейроапоптоз [144]. Подібний нейрохімічний механізм забезпечує Ангіоліну здатність зменшувати негативну неврологічну симптоматику при гострій алкогольній інтоксикації і більш прискорене відновлення після прийому великих, субтоксичних доз етанолу. Також співробітниками ЗДМУ встановлено, що Ангіолін регулює експресію білків теплового шоку – HSP₇₀, підвищуючи його концентрацію в цитоплазмі і мітохондріях нейронів як в досліді *in*

in vitro, так і в умовах експериментальної ішемії головного мозку [78, 80, 321]. У еволюційному відношенні HSP відносяться до висококонсервативних білків і виявляються у всіх організмах від бактерій до людини. Це свідчить про те, що вони виконують фундаментальні клітинні функції. Як цитопротективні властивості стрес-білків, так і їх роль в процесах нормальної життєдіяльності клітини багато в чому залежить від того, що ці білки є шаперонами. Шаперони – це білки, які полегшують формування вторинної та третинної структури інших білків. HSP також беруть участь в процесах репарації або елімінації неправильно згорнутих або денатурованих білків. Відповідно до сучасної класифікації виділяють сім (останнім часом говориться навіть про вісім) типів s HSP, які поділяють або за м.м., або по виконуваним в клітині функціям. Розрізняють малі HSP (small HSP, s HSP) з м.м. 25/27 кДа, 22 і 20 кДа, а також високомолекулярні HSP110, 100, 90, 70, 60, 40. За характером синтезу HSP (подібно NO-синтази) поділяються на конститутивні й індукцйбельні [293]. Конститутивні HSP синтезуються в клітці постійно, і для їх активації не потрібно впливу на клітину шкідливого чинника, тобто синтез їх при стресі не збільшується. Синтез індукцйбельних HSP починається незабаром після впливу на клітину пошкоджуючого агента [23, 184].

Індукцйбельний HSP₇₀ – це білок, експресія якого активується при попаданні клітини або організму в умови стресу. HSP₇₀ необхідний нейрональним клітинам для клітинного відновлення, виживання і забезпечення нормальних клітинних функцій [321]. Він також є молекулярним шапероном, який запобігає агрегації білків і відновлює пошкоджені білки у відповідь на клітинний стрес, викликаний несприятливими впливами навколишнього середовища, ішемією [33, 198]. В даний час проводиться пошук потенційних нейропротекторів, здатних посилювати експресію HSP з метою застосування їх нейропротективних можливостей для терапевтичних цілей [20, 40].

Роботами співробітників ЗДМУ встановлено, що внесення Ангіоліну в суспензію нейронів при їх інкубації з нейротоксином DNIC, підвищує в них концентрацію HSP₇₀, з 20 хвилини експерименту [197]. Таким чином, Ангіолін реалізує HSP₇₀ – опосередкований нейропротективний механізм, спрямований на пролонгацію дії антигіпоксичних білків HIF-1, транспортних білків, збільшення потужності антиоксидантної системи і активацію цитозольно-мітохондріальних шунтів синтезу АТФ в надмірному і гострому періоді патології ЦНС [13, 319]. Важливою ланкою нейропротективної дії Ангіоліну при гострій алкогольній інтоксикації є і його позитивний вплив на глутатіонову ланку тіол-дисульфідної системи [65, 292, 327, 337]. Так, нами встановлено, що Ангіолін підвищує активність ГПР, ГР і рівень відновленого глутатіону в нейронах, мітохондріях нейронів в умовах гострої ішемії головного мозку та *in vitro* при інкубації нейронів щурів з нейротоксинами DNIC і МФТП (1-метил-4-феніл-1, 2,3,6-тетрагідропірідин) [36]. Відомо, що однією з важливих резервно-адаптаційних реакцій організму у відповідь на ішемію є активація системи глутатіону; вона бере участь в реалізації цілого ряду фізіологічних процесів: детоксикації і антиоксидантного захисту; регуляції тіол-дисульфідної рівноваги; збереженні оптимального стану і функцій біологічних мембран; в обміні ряду екзаноїдів – простагландинів і лейкотрієнів [13, 329]. Глутатіон виступає як резерв цистеїну в клітці, впливає на синтез цитопротективних білків теплового шоку HSP₇₀; бере участь в реалізації механізмів термінової адаптації нейрона до несприятливих умов [56, 245].

Крім того, відомо, що глутатіон і ферменти його обміну грають важливу роль в толерантності головного мозку до ішемії. За даними ряду джерел, попередники відновленого глутатіону (GSH) – його моноетиловий ефір і N-ацетилцистеїн здатні збільшувати концентрацію GSH в клітинах, зменшуючи розмір інфаркту і покращуючи результати інсульту [22, 329]. Отримано також дані про значення GSH мітохондрій для толерантності до ішемії мозку. Експериментальними роботами показано, що попередня

надекспресія ГПР захищає тварин від інсульту і набряку, а також послаблює прояви неврологічного дефіциту; і навпаки, нокаут ГПР призводить до збільшення обсягу інфаркту мозку. В ряді робіт показано здатність глутатіону в умовах ішемії модулювати рівень активності всіх ізоформ NO-синтази (зниження активності індукцибельної і нейрональної ізоформ; підвищення – ендотеліальної) в умовах ішемії головного мозку [52, 284].

Помірна ефективність Мілдронату при гострій алкогольній інтоксикації пояснюється його активним впливом на процеси анаеробного гліколізу, що в умовах недостатності кровообігу може привести до лактат-ацидозу і набряку головного мозку [67]. Також роботами Павлова С.В. виявлено, що мілдронат не проявляє мітопротективної дії, що, в цілому, не призводить до нейропротективного ефекту в гострих станах [43, 81].

Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для поглибленого вивчення нейропротективної дії Ангіоліну при хронічній алкогольній інтоксикації.

В результаті проведених експериментальних досліджень нового оригінального препарату «Ангіолін» у вигляді таблеток, розробленого в НВО «Фарматрон», субстанція для яких отримана заводським шляхом на ДП «Завод хімічних реактивів», м. Харків (сертифікат якості № 1, серія № 010713) встановлена його виражена ендотеліопротективна, протиішемічна, нейропротективна і кардіопротективна активність в умовах хронічної алкогольної інтоксикації [52, 82, 324]. Надалі експериментально на моделі гострої алкогольної інтоксикації визначена ED_{50} Ангіоліну для щурів, яка становить 100 мг/кг внутрішньошлунково. З огляду на отримані результати гострої токсичності субстанції Ангіолін при внутрішньошлунковому введенні щурам (LD_{50} – 15000 мг/кг) і мишам (LD_{50} – 10309 мг/кг) був розрахований терапевтичний індекс Ангіоліну (100-150). В ході досліджень встановлено, що Ангіолін відноситься до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини).

Моделювання хронічної алкогольної інтоксикації у тварин призводило до посилення процесів оксидативного і нітрозативного стресів в головному мозку, про що свідчило зниження активності каталази й супероксиддисмутази. Крім того, посилювалися процеси ОМБ, а також збільшувалася концентрація стабільних метаболітів NO на фоні збільшення активності NO-синтази, підвищувався рівень нітротирозину. Численними роботами показана провідна роль нітрозуючого стресу в механізмах нейродеструкції [47]. Відомо, що NO в клітинах-мішенях утворює активні деривати, такі як нітрозоній (NO⁺), нітроксил (NO⁻) і пероксинітрит (ONOO⁻). Дослідженнями останніх років встановлено, що NO, і особливо, продукти його перетворення, такі як пероксинітрит (ONOO⁻), іон нітрозонію (NO⁺), нітроксил (NO⁻) і діазоттриоксид (N₂O₃) є основними факторами реалізації нітрозуючого стресу, в результаті якого відбувається пряма взаємодія NO з металами (гемове залізо гемоглобіну, міоглобіну, залізовмісних ензимів, а також негемове залізо залізосірчаних білків і ДНК, мідь і цинк-активних центрів ферментів), а також непряма взаємодія NO + (S-, N-, O-нітрузування) з тіольними, фенольними, гідроксильними і аміногрупами білків і ДНК. Подібна взаємодія призводить до десенсітації рецепторів, пригнічення активності мітохондріальних ферментів і фрагментації нуклеїнових кислот [164]. Реакції оксидативного і нітрозативного стресів можна розглядати як одні із загальних механізмів, які формують патологічний процес в ЦНС алкоголізованих тварин. Ці реакції, на нашу думку, є результатом порушення взаємовідношення між оксидантною і антиоксидантною складовою вільнорадикальних процесів за рахунок гіперреактивності оксидантного компонента. В ході реалізації оксидативного і нітрозативного стресів, які є реакціями на рівні організму, створюються умови для розвитку специфічних для нервової системи патологічних процесів, зокрема ексайтотоксичності, в результаті порушення обміну глутамату, що ще більше погіршує окислювальний стрес в головному мозкові, приводячи в кінцевому підсумку, до загибелі нервових клітин [325].

Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації призводило до нормалізації нітросидергічної системи головного мозку – зниження стабільних метаболітів NO на 54% і активності NO-синтази на 59%. Подібна дія Ангіоліну не тільки направлена на зниження реакцій нітрозуючого стресу, але і на регуляцію фізіологічних функцій NO і запобігання його окисній модифікації в пероксин.

Загальновідомо, що NO є нестабільним, короткоживучим радикалом і для його стабілізації і подальшого транспортування передбачені такі механізми, як утворення з тіовмісними низькомолекулярними сполуками (глутатіон, цистеїн, метіонін) стійких S-нітрозольних комплексів [56, 166]. В умовах дефіциту тіольних сполук (оксидативний стрес, алкоголізм, ішемія, інтоксикації, гіпертонічна хвороба і т.д.) порушується транспорт NO, тому що він піддається атаці таких АФК, як супероксидрадикал і гідроксирадикал з перетворенням в цитотоксичний продукт – пероксинітрит. При цьому спостерігається посилення пошкодження клітин, інтенсифікація оксидативного і нітрозуючого стресу. Рівень тіолів регулюється таким ферментом, як глутатіонредуктаза. Працями співробітників ЗДМУ встановлено, що Ангіолін володіє унікальними властивостями надавати протективну дію відносно транспорту NO за рахунок збереження відновлених тіолів [87, 197, 289]. Так, було встановлено, що введення Ангіоліну тваринам з експериментальним інфарктом міокарду підвищує рівень відновлених тіольних груп, тіомісних амінокислот - метіоніну, цистеїну, як за рахунок прямої антиоксидантної дії тіольної групи в молекулі препарату, так і за рахунок підвищення активності глутатіонредуктази. Референс-препарат Мілдронат не проявляв протективної дії щодо тіол-дисульфідної системи. Крім того, ми припускаємо, що Ангіолін сам може бути переносником NO, утворюючи з ним стабільні S-нітрозильні комплекси.

Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації призводило до зниження

інтенсивності процесів оксидативного стресу в тканинах головного мозку. Дані зміни виражалися в збільшенні активності каталази, супероксиддисмутази, зниженні процесів ОМБ і зменшенні гіперпродукції стабільних метаболітів NO. Так, введення Ангіоліну призводило до зменшення оксидативного і нітрозативного стресу – АФГ на 32% і КФГ на 36%, нітротирозину на 82% на фоні підвищення активності СОД на 160%, каталази на 248%. При оксидативному стресі і підвищенні продуктів ОМБ в мозку створюються умови для оксидативного стресу, підвищення окислювальної деструкції білків, ліпідів, що призводить до порушення структури клітинних мембран. Інтенсифікація процесів окисної деструкції компонентів клітинних мембран мозкової тканини може стати причиною змін, пов'язаних зі здатністю мембран проводити і відтворювати нервовий імпульс, порушення рецепторних, медіаторних і енергетичних систем [74]. При аналізі спонтанної окисної деструкції білків плазми крові хворих з пониженою інтелектуальною активністю, когнітивним дефіцитом було виявлено статистично достовірне підвищення рівня КФГ [244]. На фоні інтенсифікації процесів оксидативного і нітрозативного стресів, в умовах хронічної алкогольної інтоксикації, у експериментальних тварин розвивався когнітивний дефіцит, що виражалось в зниженні латентного періоду заходу в темну камеру. Призначення Ангіоліну знижувало розвиток неврологічного та когнітивного дефіциту у тварин – приводило до поліпшення показників орієнтовно-дослідницької діяльності на 151-321 %%, збільшення латентного періоду УРПУ на 134%, зменшення прояву неврологічної симптоматики (на 3 бали за McGrow). Дана обставина, на нашу думку, є переконливим патогенетичним обґрунтуванням застосування Ангіоліну для попередження і корекції когнітивного дефіциту, що розвивається в умовах хронічної алкогольної інтоксикації. Подібну дію Ангіоліну можна пояснити з точки зору його антиоксидантної активності – наявність тіольної групи в 1,2,4-триазоловому циклі призводить до появи у препарату властивостей скавенджера АФК і цитотоксичних форм оксиду азоту [13, 14, 337]. Крім

цього, Ангїюлін підвищує експресію таких антиоксидантних ферментів, як СОД, ГПР і ГР в головному мозку і міокарді тварин з ішемічною патологією [43, 80]. На фоні виснаження антиоксидантної системи тварин з моделюванням хронічної алкогольної інтоксикації спостерігалось гальмування циклу Кребса, перемикання енергетичного обміну на гліколітичний шлях з інтенсивною затратою резервів вуглеводнів і накопиченням лактату, значним зниженням рівня макроергетичних фосфатів й появою продуктів їх гідролізу [74]. Хронічна алкогольна інтоксикація протягом 30 діб призводить на 15 добу відміни етанолу до вираженого гальмування окисної продукції енергії, активації компенсаторних шляхів утворення АТФ - гліколізу і шунта Робертса, які, однак, не забезпечують повністю потребу мозку в енергії і викликають розвиток лактат-ацидозу і дефіцит нейротрансмітерних амінокислот – ГАМК і глутамату, а також і гліцину. Крім того, при хронічній алкогольній інтоксикації спостерігалась активація ГАМК-ергічної системи і виснаження її інтермедіатів і гальмівних амінокислот. Даний комплекс змін здатний привести спочатку до збільшення ГАМК і гліцину в головному мозкові; тривала алкоголізація викликає дефіцит ГАМК, гліцину, що призводить до різкої зміни активності нейронів (збудливість, провідність, секреторна і інкреторна активність), а потім і до їх загибелі.

В даний час проводяться роботи з виявлення особливостей механізмів ушкодження нейронів при хронічній алкогольній інтоксикації, пов'язаних з порушенням енергетичного метаболізму головного мозку, зокрема визначення ролі мітохондріальної дисфункції, змін в циклі Кребса, функціонування компенсаторних шунтів енергії, зокрема ГАМК-шунта [35, 61]. Багаторічними роботами показано значення ГАМК-ергічної системи у формуванні стійкості нейрону до алкогольної інтоксикації, формуванні алкогольної залежності [348]. Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК) є важливим гальмуючим нейротрансмітером центральної нервової системи, що грає значну роль в регулюванні страху, занепокоєння і зменшенні впливу

стресу [353]. ГАМК виконує роль гальма збуджуючих нейротрансмітерів, які можуть викликати страх і занепокоєння при зайвій стимуляції. Вона регулює дію норадреналіну, адреналіну, дофаміну і серотоніну, а також є важливим модулятором настрою.

Дія алкоголю, що пригнічує свідомість, в основному відбувається за допомогою активації системи ГАМК [257]. Цей ефект опосередкований головним чином через «довгу» форму частини γ_2 ГАМК А-рецепторів. Низькі концентрації алкоголю в крові потенціюють дію ГАМК на її клітинному рецепторі, а при концентрації алкоголю в крові вище 250 мг/мл вона спричиняє безпосередньо збудливу дію на рецептор. Концентрація вище 300 мг/мл може викликати смерть внаслідок пригнічення дихання [51]. При порушенні активності ГАМК-системи в мозку почнеться глобальний перекис у бік надмірної активності. Це проявиться в тому, що рухи стануть неточними, емоції – не дуже адекватними, а розумові процеси буде складно контролювати (рівень уваги буде падати) [257]. Алкоголізм по ГАМК-типу розвивається як порушення системи гальмування. Рядом досліджень показано, що одноразовий прийом етанолу призводить до збільшення ГАМК і гліцину в головному мозку, а тривала алкоголізація з подальшою відміною етанолу викликає дефіцит ГАМК та гліцину, підсилює тривогу, страх, занепокоєння і порушення сну.

Корекція порушень окисного метаболізму Ангіоліну внаслідок хронічної алкогольної інтоксикації підвищує активність власних біоенергетичних процесів за рахунок «підключення» додаткових шунтів енергетичного метаболізму мозку і інтенсифікації аеробних реакцій окиснення субстрату, а також обмежує активність шунта Робертса і, тим самим, знижує «витрачання» нейротрансмітерних амінокислот [42, 74]. Отримані результати демонструють позитивний вплив Ангіоліну на енергетичний метаболізм головного мозку після хронічної алкогольної інтоксикації, спрямований на відновлення фонду макроергів, за рахунок

нормалізації реакцій в циклі Кребса і активації енергетично більш «вигідних» шунтів енергії.

Введення Ангіоліну в лікувальному режимі призводило до нормалізації окисного метаболізму головного мозку - підвищення вмісту АТФ на 80%, малату на 73% і пірувату на 33%, а також підвищення гальмівних нейротрансмітерів – ГАМК на 157% і гліцину на 50%. Енерготропний механізм Ангіоліну є складним і може бути пояснений його позитивним впливом на компенсаторні мітохондріально-цитозольні шунти енергії і прямою мітопротективною дією. Малат-аспартатний човник здійснює перенесення відновлених еквівалентів, що утворюються в цитоплазмі в ході гліколізу, в мітохондрії в умовах ішемії. Утворений в цитоплазмі в умовах пониженого вмісту кисню, НАДН + використовується для перетворення щавелевооцтової кислоти в малат, і цей малат проникає в мітохондрії і бере участь в експорті а-кетоглутарату. Малат в мітохондріях перетворюється в щавелевооцтову кислоту з утворенням НАДН, доступним для електроннотранспортного ланцюга (з 2 протонів утворюються 3 молекули АТФ). Новоутворена з малату щавелевооцтова кислота перетворюється на α -кетоглутарат і аспартат. α -Кетоглутарат йде з мітохондрій в обмін на малат, а аспартат обмінюється на глутамат. Перенесення відбувається за рахунок градієнта глутамату і високого внутрішньомітохондріального співвідношення глутамат/аспартат [328]. Співвідношення НАДН/НАД + і малат/щавелевооцтова кислота регулюється малатдегідрогеназою (МДГ). При ішемії спостерігається гальмування малат-аспартатного шунта, що виражається в зниженні активності МДГ, зменшенні рівня малату, аспартату та глутамату. Нами в попередніх роботах показано, що Ангіолін інтенсифікує активність малат-аспартатного шунта і підвищує вироблення АТФ. Працівниками ЗДМУ встановлено, що Ангіолін достовірно знижує кількість мітохондрій з ознаками деструкції в нейронах гіпокампу при хронічній ішемії, підвищує в них вміст АТФ, запобігає неконтрольованому відкриттю циклоспорин-А-залежної велетенської мітохондріальної пори. Призначення

Мілдронату, на відміну від застосування Ангіоліну, не робило позитивного впливу на окислювальну продукцію енергії в циклі Кребса. Сумарний внесок Мілдронату в енергозабезпечення головного мозку в умовах хронічної алкогольної інтоксикації був нижче, ніж подібна енерготропна дія Ангіоліну. Нейропротективна дія Ангіоліну підтвердилася й при морфологічних дослідженнях нейронів зони СА-1 гіпокампу тварин, які перенесли хронічну алкогольну інтоксикацію. Введення Ангіоліну призводило до збільшення щільності нейронів СА-1 зони гіпокампу на 49,3%, зменшення щільності апоптично змінених нейронів на 38% та підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2 на 460%.

Профілактичне введення Ангіоліну призводило до нормалізації окисного метаболізму головного мозку – підвищення вмісту АТФ на 97%, малату на 82% і пірувату на 31%, а також підвищення гальмівних нейротрансмітерів – ГАМК на 119% і гліцину на 55%. Нейропротективна дія Ангіоліну підтвердилась і при морфологічних дослідженнях нейронів зони СА-1 гіпокампу тварин, які перенесли хронічну алкогольну інтоксикацію. Введення Ангіоліну призводило до збільшення щільності нейронів СА-1 зони гіпокампу на 57%, зменшення щільності апоптично змінених нейронів на 51% та підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2 на 500% [242].

Показано, що курсове внутрішньошлункове застосування Ангіоліну (100 мг/кг) в лікувальному і профілактичному режимі введення в умовах хронічної алкогольної інтоксикації призводить до нормалізації енергообміну нейронів, гальмуванню нітрозативного стресу і зниженню в тканинах мозку нейротоксичності деривативу NO – нітротирозину, підвищенню експресії антиапоптичного білку bcl-2 і пригніченню нейроапоптозу, а також зменшенню когнітивного дефіциту.

Вважають, що Bcl-2 є металовмісним білком, який приглушає вільні радикали, гальмує розвиток апоптозу. Білок bcl-2 запобігає загибелі клітини і функціонує як внутрішньоклітинний антиоксидант. Проведений нещодавно аналіз білків сімейства гена bcl-2 виявив складну мережу реакцій, що

регулюють апоптоз. В сімействі гена *bcl-2* одні учасники могли пригнічувати апоптоз, а інші - викликати його [144]. Серед білків, кодованих генами цього сімейства, *Bcl-2* і *Bcl-x1* діяли як репресори клітинної загибелі, в той час як *Bax* і альтернативний продукт *Bcl-x* викликали загибель клітини. Якщо *Bax* переважав над *Bcl*, то він перешкоджав пригнічуючому впливу *Bcl-2* на апоптоз. Таким чином, баланс між молекулами *Bcl-2*, *Bax* *Bcl-xL/S* може визначати долю нейронів при дії цитотоксичних агентів або стресу. Відомо, що пероксинітрит знижує рівень експресії *bcl-2*. Відомо також, що *Bcl-2* блокує зміну проникності мітохондріальної мембрани, і таким чином регулює клітинну смерть. Інгібує каспази за рахунок запобігання виходу цитохрому *C* з мітохондрій і/або за рахунок зв'язування фактору активації апоптотичної протеази. Етанол і його активні метаболіти запускають механізми апоптозу шляхом порушення експресії гена *bcl-2* [315]. Встановлено, що хронічне споживання етанолу призводить до підвищення експресії проапоптотичного гена *bax*, а також каспаз-3 в поєднанні зі зниженням експресії антиапоптотичних генів сімейства *bcl-2* призводить до активації нейроапоптозу, в першу чергу, нейронів CA1 гіпокампу і пірамідних нейронів [46]. Призначення Ангіоліну після хронічної алкогольної інтоксикації призводить до підвищення виживаності ендотеліоцитів судин капілярної мережі кори головного мозку і судинної стінки судин мозку, підвищує кількість проліферуючих ендотеліоцитів та підвищує коефіцієнт зв'язування ендотеліального фактора росту (VEGF) з ендотелієм судин [52].

Васкулоендотеліальний фактор росту (VEGF, VEGF A) – гетеродимерний глікопротеїновий ростовий фактор, продукується різними типами клітин. Варіанти VEGF позначаються як VEGF-A; -B, -C, -D. VEGF-A (165) є переважаючою формою для більшості тканин. На відміну від інших мітогенів ендотеліальних клітин, таких як bFGF (основна форма) і PDGF, VEGF синтезується як попередник, що містить 226 амінокислот. VEGF - потенційний мітоген для епітеліальних клітин судин. Із властивості VEGF

впливати на проникність судин впливає можливість залучення цього ростового фактора в зміну функцій гематоенцефалічного бар'єру в нормальних і патологічних умовах. VEGF-A є причиною вазодилатації через NO-синтезний шлях в ендотеліальних клітинах і може активізувати міграцію моноцитів. Сімейство VEGF і їх рецепторів бере участь у розвитку та рості ендотеліальних судин [82, 284]. При різних експериментальних патологіях (інфаркт міокарду, порушення мозкового кровообігу за типом ішемічного інсульту, хронічна серцева недостатність) виявляється, в залежності від тривалості патологічного процесу, підвищення та зниження експресії VEGF-A в ендотеліоцитах судин м'язового типу та зміна їх концентрації в крові тварин. Так, встановлена кардіопротективна та ендотеліопротективна активність надмалих доз препарату VEGF на моделі дисфункції ендотелію, викликаній тривалим введенням інгібітору NOS-L-NAME [227]. Гіперекспресія VEGF-A безпосередньо пов'язана з патологічними процесами, асоційованими з підвищенням ангиогенезу або збільшенням проникності судин (злоякісні новоутворення, ревматоїдний артрит, псоріаз, діабетичні ангиопатії). VEGF-C належить до сімейства VEGF. Показано, що він проявляє ангиогенні, ендотеліотропні і лімфангіогенні властивості [175].

Виходячи з проведених нами фармакологічних досліджень, отримані експериментальні результати показали, що застосування Ангіоліну за силою терапевтичної дії достовірно переверщує рефенс-препарат – Мілдронат (250 мг/кг, внутрішньошлункове введення).

Мілдронат за своєю хімічною структурою є аналогом гамма-бутиробетаїну – речовини, що проявляє вазодилативні властивості, і яка знаходиться в кожній клітині організму людини. Препарат, пригнічуючи активність гамма-бутиробетаїнгідроксилази, блокує біосинтез карнітину (перетворення гамма-бутиробетаїну в карнітин), транспорт довголанцюгових жирних кислот через оболонки клітин і карнітинзалежне окислення жирних кислот. Вторинний ефект Мілдронату полягає в зниженні рівня транспорту

вільних жирних кислот і утворення в мітохондріях ацетилкоензиму А, що запобігає несприятливому впливу на клітини [132]. Однак, Мілдронат надає недостатньо виражену терапевтичну дію при хронічній алкогольній інтоксикації. Подібний факт пояснюється тим, що Мілдронат не проявляє позитивного впливу на показники системи NO головного мозку і активність реакцій нітрозуючого стресу після тривалої алкоголізації [47, 64]. Іншими дослідниками показано, що показник мРНК eNOS в міокарді щурів з хронічною алкоголізацією при введенні Мілдронату був нижче значень інтактного, а показники мРНК iNOS були вище як щодо аналогічних показників контрольної групи, так і показників інтактного. Тобто Мілдронат не впливає на експресію мРНК eNOS і призводить до подальшого підвищення експресії мРНК iNOS експериментальних тварин [17, 64]. Також встановлено, що Мілдронат не впливає на щільність eNOS-позитивних клітин, але достовірно збільшує щільність iNOS-позитивних клітин в серці тварин з інфарктом міокарда [81, 132]. При цьому рівень стабільних метаболітів NO і ніротирозину залишається на рівні контрольної групи. Виявлений ефект препарату може бути обумовлений тим, що Мілдронат, опосередковано через підвищення концентрації гамма-бутиробетаїну, здатний впливати на регуляцію NFκB і експресію iNOS. Крім того, Мілдронат не регулює активність окисної продукції енергії в головному мозку і не усуває проявів енергетичного дефіциту на фоні тривалої алкоголізації, що негативно позначається на відновленні біоелектричних процесів нейрона і на когнітивно-мнестичних функціях експериментальних тварин [67].

В результаті проведених досліджень нами була встановлена висока нейропротективна активність нового похідного L-лізину – Ангіоліну при лікувальному і профілактичному режимах введення тваринам, що тривалий час отримували етанол. Нейропротективну дію Ангіоліну спрямовано на зменшення неврологічної симптоматики піддослідних тварин, поліпшення енергетичного метаболізму головного мозку і зниження енергетичного дефіциту, підвищення щільності нейронів CA1-гіпокампу і ендотеліоцитів

судин головного мозку і підвищення в них РНК, гальмування нейроаптозу і підвищення концентрації bcl-2, зменшення нітрозативного і оксидативного стресів, підвищення активності антиоксидантних ферментів. Базуючись на отриманих даних про нейропротективні властивості Ангіоліну в умовах хронічної алкогольної інтоксикації, а також даних інших дослідників про захисну дію цієї сполуки щодо головного мозку при моделюванні церебральної ішемії, можна зробити припущення про механізм його дії. Ми вважаємо, що в механізмі нейропротективної дії Ангіоліну лежить його нормалізуючий ефект щодо таких сполучених систем головного мозку, як NO і тіол-дисульфідна [221, 292]. Внаслідок цього Ангіолін володіє унікальними властивостями надавати протективну дію відносно NO за рахунок збереження відновлених тіолів [226]. Ангіолін має виражену антиоксидантну дію, будучи скавенджером NO і АФК, і підвищуючи активність антиоксидантних ферментів – СОД, каталази і ГПР. Подібна дія запобігає перетворенню NO в пероксинітрит або іон нітрозонія під дією АФК і знижує ініціювальні механізми нітрозуючого стресу і NO-залежні механізми нейроаптозу [38]. Підвищуючи рівень відновлених тіолів, зокрема глутатіону, як в цитоплазмі, так і в мітохондріях нейронів, Ангіолін призводить до збільшення внутрішньомітохондріального рівня білка шаперона HSP₇₀. За допомогою підвищення внутрішньомітохондріального рівня глутатіону і HSP₇₀. Ангіолін проявляє мітопротективну дію і здатний також впливати на активацію і регуляцію компенсаторних шунтів енергії [42, 43]. Таким чином, отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для застосування Ангіоліну в комплексній терапії алкогольного захворювання як нейропротективного препарату [139].

ВИСНОВКИ

У дисертаційному дослідженні наведено нове вирішення актуальної наукової задачі фармакології, яке полягає в експериментальному обґрунтуванні доцільності застосування найбільш активного з'єднання L-лізину: (S) -2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Ангіоліну) в якості нейропротективного засобу для лікування алкогольної хвороби.

1. В результаті первинного скринінгу нейропротективної активності серед чотирьох сполук L-лізину на моделі гострої алкогольної інтоксикації виявлено сполуку з найбільш вираженою бажаною дією – сполука (S) -2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5 тіоацетату (Ангіолін), яка відноситься до V класу токсичності (ЛД₅₀ при внутрішньошлунковому введенні щурам -15000 ± 211 мг/кг).

2. Введення тваринам протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації, а також профілактично паралельно 30-добової алкоголізації внутрішньошлунково Ангіоліну, в експериментально обґрунтованій дозі 100 мг/кг призводило до покращення показників орієнтовно-дослідницької діяльності на 321-368 %%, збільшення латентного періоду УРПУ на 134-928 %%, зменшення прояву неврологічної симптоматики (на 3-4,5 балів по McGraw).

3. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації, а також профілактично паралельно 30-добовій алкоголізації призводило до збільшення щільності нейронів СА-1 зони гіпокампу на 49-57 %%, зменшення щільності апоптично змінених нейронів на 38-51 %%, підвищення експресії білка bcl-2 на 460-500%.

4. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації, а також профілактично паралельно 30-добовій алкоголізації призводило до

зменшення оксидативного і нітрозативного стресу – АФГ на 32-46 % і КФГ на 36-43 %, стабільних метаболітів NO на 54-67 % і активності NO-синтази на 59-68 %, нітротирозину на 67-73 % на фоні підвищення активності СОД на 160-168 %, каталази на 248-271 % .

5. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації, а також профілактично паралельно 30-добовій алкоголізації призводило до нормалізації окисного метаболізму головного мозку - підвищення вмісту АТФ на 80-97 %, малату на 73-82 % і пірувату на 31-33 %, а також підвищення гальмівних нейротрансмітерів – ГАМК на 119-157 % і гліцину на 50-55 %.

6. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації призводило до підвищення щільності ендотеліоцитів капілярної сітки кори головного мозку на 38% і судинної сітки судин мозку на 42%, підвищувало вміст РНК в ендотеліоцитах на 37% і 41% відповідно, а також збільшувало щільність проліферуючих ендотеліоцитів в цих судинах на 47% і 142% відповідно, а також призводило до підвищення експресії фактору росту ендотелію (VEGF) в капілярній мережі і в судинах мозку на 88% і 367% відповідно.

7. Ангіолін в умовах хронічної алкогольної інтоксикації при лікувальному і профілактичному режимах введення достовірно перевищує референс-препарат мілдронат за такими показниками нейропротективної активності як щільність нейронів і частка апоптично змінених нейронів СА-1 зони гіпокампу, рівень антиапоптичного білка bcl-2, концентрація АТФ та експресія фактору росту ендотелію (VEGF).

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. (3-бензилксантиніл-8)метилтіоацетати: антиоксидантна дія в умовах модельованого нітрозуючого стресу *in vitro* / К. В. Александрова та ін. Запорозж. мед. журн. 2011. Т. 13, № 5. С. 137–139.
2. HSP - опосредованные механизмы нейропротективного действия селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (SERM) / И. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов, С. В. Павлов, Н. В. Бухтиярова. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 5. С.24.
3. Абросимов Д. А., Бугрова М. Л. Изменения содержания мозгового натрийуретического пептида в кардиомиоцитах крыс в условиях раннего постперфузионного периода под воздействием мексидола. Морфология. 2015. Т. 147, № 3. С. 61.
4. Аваков В. Е. Применение L-лизина эсцината у пациентов с черепно-мозговой травмой и острым ишемическим инсультом. Укр. мед. часопис. 2015. № 2. С. 56–58.
5. Аваков В. Е., Сайипов Р. М., Исомов Т. М. Применение L-лизина эсцината в комплексной терапии пациентов с черепно-мозговой травмой и острой ишемией мозга. Укр. мед. часопис. 2014. № 2. С. 129–131.
6. Агонисты дофаминовых рецепторов: новые формы и новые возможности в лечении болезни Паркинсона / Е. А. Катунина и др. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115, № 5. С. 34–40.
7. Агоністи дофамінових рецепторів у комплексній патогенетичній терапії хвороби Паркінсона : метод. рекомендації / уклад. : І. М. Карабань, Н. В. Карасевич. К., 2015. 36 с.
8. Активация нейронов медуллярных центров автономной нервной системы крыс при реализации ими мотивированных оперантных движений / О. В. Власенкои др. Нейрофизиология. 2010. Т. 42, № 5. С. 390–404.

9. Алексеев С.Б., Смирнова И.П. Особенности действия противоопухолевого фермента L-лизин-альфа-оксидазы *Trichoderma* sp. Антибиотики и химиотерапия. 2007. Т. 52, № 11/12. С. 25–29.
10. Амосова Е.Н. Метаболическая терапия повреждений миокарда, обусловленных ишемией: новый подход к лечению ИБС и сердечной недостаточности. К., 2000. 8 с.
11. Антиапоптическое действие тиоцетама при депривации системного уровня восстановленного глутатиона нейронов коры *in vitro* / С. В. Горбачева и др. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 5. С.72.
12. Антиоксиданти: клініко-фармакологічний аспект / І. С. Чекман та ін. Укр. мед. часопис. 2014. № 1 (99). С. 22–28.
13. Антиоксидантна та церебропротекторна дія N-, S-вмісного похідного хіназолону за гострої ішемії головного мозку в щурів / Ю. І. Губський та ін. Укр. біохім. журн. 2012. Т. 84, № 5. С. 89–96.
14. Антипенко Е. А. Адаптогенные эффекты мексидола при хронической ишемии головного мозга. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012. Т. 112, № 3. С. 44–49.
15. Антонюк Т. Роль цитиколина при когнитивных нарушениях. *НейроNews*. 2016. № 1. С. 24–26.
16. Артемьева Г. Вне зависимости: [причины и последствия алкогольной и наркозависимости]. Будь здоров!. 2010. № 2. С. 64–71.
17. Арутюнов Г.П. Опыт применения препарата милдронат для лечения острого инфаркта миокарда. *Клинич. геронтология*. 1996. № 1. С.3–7.
18. Аталиева А. А. Био-психо-социо-духовный подход к проблеме наркомании и алкоголизма и его значение для программы реабилитации «12 шагов». *Вісник Одеського нац. ун-ту. Сер. Психологія*. 2012. Т. 17, вип. 8 (20). С. 223–330.
19. Афанасьев В. В. Взаимодействие нейропротекторов. *Лікарська справа*. 2012. № 7, спец. вип. С. 5–11.

20. Афанасьев В. В. Клиническое применение цитиколина и его роль в гомеостазе клеточных мембран нейронов и органов-эффекторов. Медицина неотложных состояний. 2016. № 1. С. 46–50.

21. Ахапкина В. И., Ахапкин Р. В. Выявление и оценка нейрорепродуктивной активности фенотропила. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013. Т. 113, № 7. С. 42–46.

22. Багаурі О. В., Ходаківський О. А. Характеристика морфологічних змін сомато-сенсорної кори головного мозку щурів на тлі експериментальної терапії модельного інсульту похідним 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу (сполука R-86) та цитиколіном. Укр. мед. альманах. 2013. Т. 16, № 5. С. 3–7.

23. Беленичев И. Ф. Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2013. № 6. С. 72–80.

24. Беленичев И. Ф., Бухтиярова Н. В., Середа Д. А. Современные направления нейропротекции в терапии острого периода патологии головного мозга различного генеза. Междунар. неврологич. журн. 2010. № 2. С. 76–86.

25. Беленичев И. Ф., Егоров А. А. Соединения L-лизина в фармакокоррекции нарушений энергетического метаболизма головного мозга при моделировании геморрагического инсульта. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2013. № 6. С. 3–8.

26. Беленичев И.Ф., Егоров А.А., Спахи О.В. Снижение апоптической гибели нейронов CA1 зоны гиппокампа крыс в условиях пренатальной хронической алкоголизации и на фоне введения цереброкурина и тиоцетама. Нейронауки: теоретич. и клинич. аспекты. 2012. Т. 8, № 2. С. 145–151.

27. Беленичев И. Ф., Егоров А. Н., Соколик Е. П. Фармакологическая модуляция экспрессии транскрипционного фактора C-Fos в головном мозге пренатально алкоголизированных крыс. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 5. С. 25.

28. Беленичев И. Ф., Литвиненко. Е. С. Ферментативное и не ферментативное звено тиол-дисульфидной системы в головном мозге экспериментальных животных с церебральной ишемией: эффекты селеназы. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2015. № 1. С. 13–18.

29. Беленичев И. Ф., Павлов С. В., Бухтиярова Н. В. Фармакологическая модуляция соотношений NO и тиол-дисульфидной системы – новое направление нейропротекции. Медицина неотложных состояний. 2010. № 2 (27). С. 65–71.

30. Беленичев И. Ф., Павлов, С. В., Дунаев В. В. Нейропротекторное действие цереброкурина в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения. Эксперим. и клинич. фармакология. 2010. Т. 73, № 2. С. 6–9.

31. Беленичев И. Ф., Пархоменко В. В. Митохондриальная по-синтаза - перспективная мишень нейропротекции. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 5. С. 25–26.

32. Беленичев И. Ф., Соколик Е. П. Содержание маркеров окислительной модификации и нитрозилирования белков в головном мозге при введении цереброкурина, кортексина и церебролизина на фоне алкогольной интоксикации. Запорож. мед. журн. 2011. № 3. С.5–7.

33. Беленичев И. Ф., Соколик Е. П. Фармакокоррекция нейропептидами нитрозирующего стресса и неврологических нарушений при экспериментальной алкогольной интоксикации. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 5. С.26–27.

34. Беленичев И. Ф., Соколик Е. П. Фармакологическая модуляция системы оксида азота при моделировании хронической алкогольной интоксикации у крыс. Эксперим. и клинич. фармакология. 2011. Т. 74, № 10. С. 43–45.

35. Беленичев И. Ф., Соколик Е. П., Павлов С. В. Фармакологическая модуляция компенсаторных механизмов энергетического метаболизма в

головном мозге пренатально алкоголизированных животных. Вестник новых мед. технологий. 2014. Т. 21, № 3. С. 54–57.

36. Беленичева О. И., Полякова Е. Н., Однокоз Е. В. Влияние селективного модулятора эстрогеновых рецепторов (SERM) на состояние глутатионового звена тиол-дисульфидной системы и NO в нейронах коры старых и молодых животных при экспериментальном ОНМК. Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. 2013. № 2 (Додаток). С.4–5.

37. Белоусов Ю. Б., Мухина М. А. Фенотропил – ноотропный препарат нового поколения. Міжнар. неврологіч. журн. 2006. № 4. С. 119–127.

38. Белоусова М. А., Корсакова Е. А., Городецкая Е. А. Новые антиоксиданты как нейропротекторы при ишемических повреждениях головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях. Эксперим. и клинич. фармакология. 2014. Т. 77, № 11. С. 36–44.

39. Белякова А. Г. Сравнительная оценка действия L-лизина энцианата и контрикала на напряжение кислорода и обмен веществ в головном мозге в условиях общей широкополосной вибрации. Вестн. физиотерапии и курортологии. 2012. Т. 18, № 4. С. 26–28.

40. Беленічев І. Ф., Демченко А. В. Порівняльне оцінювання ефективності дії сучасних нейропротекторів в умовах експериментальної хронічної ішемії мозку. Запорж. мед. журн. 2015. № 2. С. 37–41.

41. Беленічев І. Ф., Єгоров М. А., Соколик О. П. Порушення оксидативного гомеостазу в головному мозку новонароджених, зумовлене пренатальною алкоголізацією: ефекти цереброкуруину і тіоцетаму. Мед. хімія. 2011. Т. 13, № 4. С. 13–15.

42. Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І., Мазур І. А. Вплив нового метаболіотропного кардіопротектора «Лізиній» на стан лімітуючих ланок енергетичного обміну і компенсаторних метаболічних шунтів в умовах гострого інфаркту міокарда. Клінічна фармація. 2012. Т. 16, № 2. С. 36–39.

43. Беленічев І. Ф., Павлов С. В., Кучеренко Л. І. Нейро- та мітопротективний ефекти Ангіоліну та Цереброкуруину. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2015. № 6 (46). С. 17.

44. Беленічев І. Ф., Павлов С. В., Мазур І. А. Деякі механізми ендотеліопротективної дії нового оригінального препарату лізинію в умовах експериментального ішемічного пошкодження головного мозку. Одес. мед. журн. 2011. № 2. С. 21–24.

45. Беленічев І. Ф., Соколик О. П. Експериментальна фармакокорекція порушень поведінки нейропептидними ноотропами в умовах 30-денної алкоголізації. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2010. № 1/2. С. 11–16.

46. Беленічев І. Ф., Соколик О. П., Абрамов А. В. Фармакологічна модуляція сигналіngu апоптозу нейронів СА1-зони гіпокампа щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 6. С. 15–21.

47. Беленічев І. Ф., Жернова Г. О. Вплив нейротрофічних церебропротекторів на розвиток нітрозуючого та окиснювального стресу при моделюванні інтрацеребрального крововиливу. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2010. № 6. С. 3–6.

48. Биохимические механизмы регуляции продукции энергии в условиях экспериментальной острой церебральной ишемии / Ю. М. Колесник и др. Доп. НАН України. 2011. № 9. С. 165–170.

49. Білай І. М., Михайлюк Є. О. Дослідження гепатопротекторної активності N-заміщених 1,2,4-тріазолу на моделі токсичного ураження печінки. Запорозж. мед. журн. 2012. № 4. С. 88–90.

50. Блынская Е. В., Карбушева Е. Ю., Алексеев К. В. Нейролипиды, простамины и их синтетические аналоги как перспективные нейропротекторы. Эксперим. и клинич. фармакология. 2010. Т. 73, прил. (5-я Междунар. конф. "Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам"). С. 27.

51. Бородкина Л. Е., Багметова В. В., Тюренков И. Н. Сравнительное изучение нейротекторного и противосудорожного действия циклических аналогов ГАМК пирацетама, фенотропила, фепирона и его композиций с органическими кислотами. *Вопр. биологич., мед. и фарм. химии.* 2012. № 8. С.14–20.

52. Бувальцев В. И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения ИБС. *Международ. мед. журн.* 2001. № 3. С. 202–208.

53. Ваизова О. Е. Роль эндотелиальных факторов в регуляции сосудистого тонуса и локального гомеостаза. *Сиб. мед. журн.* 2000. № 2. С. 27–37.

54. Ваизова О. Е. Влияние нейротекторных средств холинопозитивным действием на уровень специфических маркеров нервной ткани при остром нарушении мозгового кровообращения. *Эксперим. и клинич. фармакология.* 2012. Т. 75, № 3. С. 7–9.

55. Васильева Е. В., Золотарев Ю. А., Ковалев Г. И. Влияние ноотропных препаратов на метаболиторопные глутаматные рецепторы мозга мышей BALB/c and C57BL/6 /. *Нейрохимия.* 2013. Т. 30, № 2. С. 135–141.

56. Велесницкая Д. В., Пехота Н. Н., Ценкель Н. А. Использование глутатиона для перорального приема в целях увеличения его концентрации в крови крыс. *Фундаментальные науки - медицине : материалы междунар. науч. конф.* Минск, 2013. С. 122–124.

57. Вивчення гіполіпідемічної активності 7-(2-гідрокси-3-ізопропоксипропіл)-3-метил-8-(4-метилпіперидин-1-іл)-ксантину при експериментальній гіперліпідемії у кролів / І. М. Білай, А. О. Остапенко, М. І. Романенко, М. П. Красько. *Запорж. мед. журн.* 2011. Т. 13, № 4. С. 8–10.

58. Визир В. А., Березин А. Е. Перспективы реверсии эндотелиальной дисфункции у больных застойной сердечной недостаточности. *Клинич. медицина.* 2000. № 7. С. 36–39.

59. Власенко О. В., Рокунець І. Л., Чечель В. В. Телеметрична восьмиканальна система передачі фізіологічних параметрів лабораторних тварин. Актуальні проблеми сучасної медицини. 2010. Т. 10, № 1. С. 9–14.

60. Влияние Ангиолина на морфо-функциональные показатели СА-1 зоны гиппокампа и процессы нейроапоптоза при моделировании хронической алкогольной интоксикации при лечебном режиме введения / Беленичев И.Ф., Павлюк И.В., Абрамов А.В. Кучеренко Л.И. // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал Випуск 1, том 1(126), 2016 С.130-136.

61. Влияние Ангиолина на показатели митохондриальной дисфункции головного мозга у крыс после формирования хронической алкогольной интоксикации. /Павлюк И.В. // Тези доповідей «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» 12-13 травня 2016 р.

62. Влияние мексидола на мозговое кровообращение в условиях сосудистой патологии мозга и сердца / А. В. Гнездилова, М. А. Лебедева, Д. В. Масленников, Р. С. Мирзоян. Эксперим. и клинич. фармакология. 2010. Прил. (5-я Междунар. конф. "Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам", г. Москва, 1-4 июня 2010 г.). С. 35.

63. Влияние мексидола на неврологический дефицит, социально-бытовую адаптацию и синдромы неглекта и "отталкивания" у пациентов после инсульта. Инсульт. 2011. Т. 111, № 12 (вып. 2). С. 52–57.

64. Влияние милдроната на поведенческие реакции у крыс, с принудительной алкоголизацией в условиях низкогогорья / В. М.Петров, Г. И.Горохова, В. А.Лемешенко, Е. Г. Филиппченко. Физиология, морфология и патология человека и животных в условиях Кыргызстана : сб. ст. мед. ф-та КРСУ. Бишкек, 2010. Вып. 10. С. 111–116.

65. Влияние нейро- и эндотелиопротектора «Лизиния» на состояние тиол-дисульфидной системы и пов нейронах в условиях моделирования церебральной ишемии // Мазур И.А., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И.,

Абрамов А.В., Бухтиярова Н.В., Павлюк И.В. // Український медичний альманах, 2012, том 5 № 5 (додаток). С. 336.

66. Влияние Тиоцетама на показатели нитрозирующего стресса в головном мозге животных с хронической алкогольной интоксикацией / Беленичев И.Ф., Павлюк И.В., Кучеренко Л.И., Мазур И.А., Кучер Т.В. // Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» Сборник материалов конгресса. Москва 7-11 апреля 2014 г. с. 206.

67. Влияние терапии милдронатом на эффективность физических тренировок на стационарном этапе реабилитации больных с сердечной недостаточностью / А.О. Недошивин и др. Пробл. реабилитации. СПб, 2001. № 1 (4). С.83–86.

68. Влияние тиотриазолина на интегративную функцию центральной нервной системы крыс при хронической алкогольной интоксикации / Ю. М. Колесник и др. Доп. НАН України. 2012. № 6. С. 163–168.

69. Влияние фармакологического средства на основе пантогама, янтарной кислоты и хитозана на свободнорадикальный гомеостаз тканей крыс при ишемии/реперфузии головного мозга / О. А. Сафонова и др. Вопр. биологич., мед. и фармац. химии. 2011. № 9. С. 44–48.

70. Влияние фенотропила на степень восстановления пациентов после перенесенного инсульта / В. В. Ковальчук и др. Инсульт. 2010. Т. 110, № 12 (вып. 2). С. 38–40.

71. Волкова О. С., Рябоконт Е. Н., Головкин Н. П. Фагоцитарная активность нейтрофилов крыс, содержащихся на кариезогенной диете с добавлением лецитина, растительного масла и препарата кальция. Укр. стоматологич. альманах. 2010. № 2. С. 7–10.

72. Воронков Л.Г. Хронічна серцева недостатність у хворих похилого віку: особливості патогенезу, діагностики та фармакотерапії. Серце і судини. 2005. № 2. С. 89–96.

73. Восстановительный период ишемического инсульта: роль и местонейропротекторной терапии. Здоров'я України. 2013. № 1 (Неврологія. Психіатрія. Психотерапія). С. 30–31.

74. Вплив нового метаболітотропного кардіопротектора "Лізіній" на стан лімітуючих ланок енергетичного обміну і компенсаторних метаболічних шунтів в умовах гострого інфаркту міокарда / Беленічев І.Ф., Кучеренко Л.І., Мазур І.А., Бухтіярова Н.В., Стеблюк В.С., Павлюк І.В., Георгієвський Г.В. // Клінічна фармація.-2012.-Т.16, №2. Харків. С.36-39.

75. Вплив таурину та пірацетаму на біохімічні показники в головному мозку щурів при циркуляторній гіпоксії / І. С. Чекман та ін. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2012. № 1 (26). С. 24–28.

76. Вплив цереброкуруину і тіоцетаму на ранню відповідь геному та морфофункціональний стан нейронів СА-1 зони гіпокампа щурів за умов пренатальної алкоголізації / О. М. Єгоров та ін. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2012. № 5. С. 21–25.

77. Ганцггорн Е. В., Хлопонин Д. П., Макляков Ю. С. Патологические основы современной фармакотерапии острой нейропротекции. Мед. вестник Юга России. 2013. № 2. С. 4–12.

78. Гипотензивные и нейропротекторные свойства 0,15% раствора бримонидина/пурит при нормотензивной глаукоме / С. В. Присяжная, Г. М. Цехницкая, И. А. Билык, Т. А. Сыч. Таврический медико-биологич. вестник. 2013. Т. 16, № 3, ч. 2 (63). С. 121–125.

79. Гисто- и цитоархитектоника гиппокампа неполовозрелых крыс на фоне введения пропофола и мексидола / Т.К. Дубовая и др. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2010. Т. 149, № 4. С. 457–459.

80. Глутатіон-залежні механізми нейропротективної дії нового метаболітотропного препарату «Анжіолін» за умов індукції нітрозуючого стресу *invitro* / С. В. Горбачова, І. Ф. Беленічев, Л. І. Кучеренко, Н. В. Бухтіярова. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2015. № 6 (46). С. 12–16.

81. Голоколенова Г.М. Опыт применения милдроната у больных ишемической болезнью сердца, осложненной сердечной недостаточностью. Эксперим. и клинич. фармакотерапия. Рига : Зинатне, 2011. Вып. 19. С. 159–163.
82. Гомазков О.А. Молекулярные и физиологические аспекты эндотелиальной дисфункции. Роль эндогенных химических регуляторов. Успехи физиол. наук. 2000. Т.31, № 4. С.48–61.
83. Гомазков О.А. Эндотелий "эндокринное дерево". Природа. 2000. № 5. С.38–46.
84. Григорова І. А., Куфтеріна Н. С. Станнейротрофічного фактора BDNF у різні періоди легкої черепно-мозкової травми. Укр. вісн. психоневрології. 2012. Т. 20, № 3. С. 87–88.
85. Губський Ю. І. Вивчення антиоксидантної активності та церебропротекторної дії похідного триметилфенолу - сполуки МВ-5 - при моделюванні гострої ішемії головного мозку щурів. Журн. АМН України. 2010. Т. 16, № 4. С. 691–700.
86. Данилов С. А. Порівняльне вивчення нейропротекторної активності препаратів собачої кропиви. Клінічна фармація. 2011. Т. 15, № 4. С. 64–68.
87. Демченко А. В., Беленічев І. Ф. Оцінювання впливutipроцетаму на глутатіонову ланку тіол-дисульфідної системи головного мозку в умовах експериментальної хронічної ішемії. Патологія. 2015. № 2. С. 101–105.
88. Демченко А. В., Беленічев І. Ф. Стан глутатіонового ланцюга тіол-дисульфідної системи мозку білих щурів після корекціїцитиколіном модельованої хронічної ішемії. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2015. № 3. С. 28–34.
89. Денисенко О. В., Шандра О. А., Карпов Л. М. Ефекти введення ізопікамілону та пікамілону в умовах формування пікротоксин-індукованої генералізованої активності у щурів. Досягнення біології та медицини. 2012. № 2. С. 10–16.

90. Денисюк Н. Б. Оцінка нейропротекторної ефективності брімонідину 0,2% у пацієнтів з первинною відкритокутовою глаукомою. Офтальмол. журн. 2011. № 5. С. 64–66.

91. Денисюк О. М. Порівняльний вплив флокаліну тамексидолу на перебіг біоенергетичних процесів при гострій експериментальній ішемії головного мозку. Буковин. мед. вісник. 2011. Т. 15, № 1. С. 131–134.

92. Денисюк О. М., Степанюк Г. І. Скрінінг церебропротекторної активності в ряду нових похідних гуанідину на моделі гострої ішемії головного мозку. Клінічна та експерим. патологія. 2010. Т. 9, № 4. С. 32–34.

93. Дзяк Л. А., Сирко А. Г. Метаанализ результатов клинических исследований эффективности и переносимости L-лизина эсцината при лечении черепно-мозговой травмы и острых нарушений мозгового кровообращения. Міжнар. неврологіч. журн. 2015. № 6. С. 29–39

94. Доклинические исследования лекарственных средств / С. М. Дроговоз и др. ; под ред. А. В. Стефанова. К. : Авиценна, 2002. 568 с.

95. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных лекарственных средств первичной и вторичной нейропротекции : метод. рекомендации ГЭЦ МЗ Украины /И. С. Чекман и др. К. : Юстон, 2016. 82 с.

96. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов : метод. рекомендации / И. С. Чекман и др. К. : Гос. Фармакологический Центр МОЗ Украины, 2010. 81 с.

97. Доклиническое изучение специфической активности эндотелиопротективных препаратов : метод. рекомендации ГЭЦ МЗ Украины / И. С. Чекман и др. К., 2014. 60 с.

98. Доклиническое исследование эмбриотоксичности и тератогенности препарата Лизиний / И. А. Мазур и др. Патологія. 2011. № 2. С. 85–88.

99. Долго-Сабуров В.Б. Центральные нейрохимические эффекты острого и хронического воздействия этанола. Механизмы толерантности и

зависимости // Биомедицинский журнал Medline.ru. - 2011. - т. 12. -С. 1423-1436.

100. Евтушенко И. С. Ноотропы и нейротекторы в современной клинической нейрофармакологии. Міжнар. неврологіч. журн. 2013. № 3. С. 20–27.

101. Энерготропный механизм церебропротективной дії нового оригинального препарата «Лізиній» за умов моделювання гострого порушення мозкового кровообігу / І. Ф. Беленічев, С. В. Павлов, Л. І. Кучеренко, І. А. Мазур. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2013. № 4-5. С. 14–18.

102. Ершов В. И. Сравнительные аспекты применения нейротекторов при ведении больных с ишемическим инсультом. Инсульт. 2011. Т. 111, № 8 (вып. 2). С. 41–44.

103. Ефекти нового ендотеліопротектора "Лізиній" на систему глутатіону та NO-синтазну активність у головному мозку за умов гострої церебральної ішемії / І. Ф. Беленічев, С. В. Павлов, І. А. Мазур, Л. І. Кучеренко. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 3. С. 40–45.

104. Єгоров О. М., Беленічев І. Ф., Соколик О. П. Стан глутатіонової системи головного мозку пренатально алкоголізованих щурів на фоні курсового призначення цереброкуруину й тіоцетаму. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2012. № 2. С. 31–36.

105. Жернова Г. О. Вплив нейротрофічних церебропротекторів на розвиток постгеморагічного енергодефіциту в щурів. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 2. С. 3–9.

106. Жернова Г. О. Нейротрофічні церебропротектори - високоефективні модулятори мітохондріальної активності. Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. 2011. Вип. 24, № 2 (додаток). С. 20.

107. Жернова Г. О. Нейротрофічні церебропротектори у фармакокорекції енергетичних процесів головного мозку при моделюванні

інтрацеребрального крововиливу : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук. К., 2011. 20 с.

108. Жилюк В. И., Мамчур В. И., Левых А. Э. Значение эндотелиотропных и антиагрегантных свойств в нейропротективном действии прамирацетама при аллоксановом диабете. Патология. 2010. Т. 7, № 1. С. 56–58.

109. Жилюк В. И., Мамчур В. И., Павлов С. В. Роль функционального состояния митохондрий нейронов коры большого мозга в механизме ноотропного действия препаратов с нейропротекторными свойствами у крыс с аллоксановой гипергликемией. Эксперим. и клинич. фармакология. 2015. Т. 78, № 2. С. 10–14.

110. Жилюк В. І. Дослідження впливу пірацетаму та прамірацетаму на прояви когнітивного дефіциту у щурів за умов аллоксанового діабету. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2009. № 4. С. 14–19.

111. Жилюк В. І. Стан процесів вільнорадикального окислення в утвореннях головного мозку у аллоксан-діабетних щурів за умов застосування пірацетаму та прамірацетаму. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2009. № 5. С. 47–51.

112. Жилюк В. І., Мамчур В. Й. Активність процесів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків в утвореннях головного мозку щурів при хронічній гіперглікемії за умов застосування ноотропних засобів. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 5. С. 112–114.

113. Жилюк В. І., Мамчур В. Й. Вплив ноотропних засобів на активність синтази оксиду азоту та вміст нітротирозину в корі головного мозку щурів із тривалою аллоксан-індукованою гіперглікемією. Досягнення біології та медицини. 2012. № 2 (20). С. 16–19.

114. Заморский И. И. Сравнение нейропротекторной эффективности пинеальных препаратов при острой гипоксии. Фізіол. журн. 2012. Т. 58, № 4. С. 62.

115. Застосування (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату як активної основи лікарських засобів для профілактики та лікування порушень життєзабезпечуючих функцій ЦНС при важких формах гострого отруєння етанолом. / Кучеренко Л.І., Беленічев І.Ф., Мазур І.А., Павлюк І.В., Бідненко О.С. // Патент на винахід № 111462 Україна. МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01), Заявник ТОВ НВО «Фарматрон». - № 2016 00367; Дата подання 16.01.2016; Опубл. 25.04.2016.

116. Зенков Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М. : МАИК Наука/Интерприодика, 2001. 343 с.

117. Знаменська Т. К., Кирилова Л. Г., Швейкіна В. Б. Сучасний підхід донейропротекторної терапії недоношених новонароджених з гіпоксично-ішемічним ушкодженням головного мозку. Совр. педиатрия. 2012. № 6. С. 98–102.

118. Иванец Н. Н., Ахапкина В. И. Применение Фенотропила у больных хроническим алкоголизмом. Тез. докл. XI Рос. нац. конгресса «Человек и лекарство». М., 2004. С. 169.

119. Изучение кардиопротективных и противоишемических свойств тиотриазолина при артериальной гипертензии / Павлюк І.В., Стеблюк В.С. // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2012 № 2 (9) додаток. С. 29.

120. Иммуномодулирующие свойства производных фенотропила / М.А. Самоутруева и др. Фармация. 2011. № 1. С. 28–30.

121. Исследование нейропротекторных, противогипоксических и антиамнестических свойств новой смеси трипептидов / В. В. Яснецов и др. Эксперим. и клинич. фармакология. 2015. Т. 78, № 1. С. 3–8.

122. Ігнащук О. В., Серкова В. К. Вплив терапії ноофеном на стан автономної нервової системи у хворих на гастроєзофагеальну рефлюксну хворобу. Мед. перспективи. 2010. Т. 15, № 4. С. 52–56.

123. Ізюмець О. І., Моравська О. А., Гончарук О. С. Нейропротекторна корекція перинатальних пошкоджень ЦНС у дітей. Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. 2013. № 2. С. 60–61.

124. Казакова А. А. Участь глутаматергічної системи в механізмі ноотропної дії нових похідних цис-3-ариліден(гетераліден)-1,2-дигідро-1,4-бенздіазепін-2-онів. Укр. журн. клініч. та лаб. медицини. 2011. Т. 6, № 1. С. 119–122.

125. Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Новичкова М. Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. Успехи биологич. наук. 2014. Т. 54. С. 299–348.

126. Капай Н. А., Солнцева Е. И., Скребицкий В. Г. Донебезилустраняет ингибирующее влияние бета-амилоидного пептида (1-42) на длительную потенциацию в гиппокампе. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2010. Т. 149, № 1. С. 38–41.

127. Капечук В.В., Савко В. В. Эффективность препарата L-лизина эсцината в комплексном лечении острой сосудистой оптической нейропатии и его влияние на состояние липофильной антиоксидантной системы. Офтальмол. журн. 2009. № 3. С. 50–54.

128. Карлійчук М. А., Пінчук С. В., Зубович М. П. Нейропротекторний ефект цитиколіну після панретинальної лазеркоагуляції у хворих на цукровий діабет. Міжнар. ендокринологіч. журн. 2013. № 6. С. 103–104.

129. Карпов С. М., Осипова Н. А., Высочина А. А. Токсическое влияние суррогатов алкоголя на формирование синдрома ретробульбарного неврита. Междунар. науч.-исслед. журн. 2013. № 10-5(17). С. 14.

130. Касаткин Д. С. Нейроваскулярная единица как точка приложения действия некоторых вазоактивных и нейропротекторных препаратов. Здоров'я України. 2012. № 20. С. 38–39.

131. Кирилова Л. Г., Мірошников О. О. Нейропротекторна терапія при неврологічних ураженнях у дітей раннього віку з пре- та перинатальною патологією. Укр. мед. часопис. 2015. № 4. С. 37–41.

132. Клиническая эффективность и безопасность милдроната при лечении хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца / Р. С. Карпов и др. Кардиология. 2011. №. 6. С. 69–74.

133. Клініко-нейрофізіологічна оцінка когнітивних функцій у хворих за хронічної ішемії головного мозку в період відновлення після хірургічного втручання / Л. Л. Чеботарьова та ін. Укр. нейрохірургіч. журн. 2014. № 1. С. 10–15.

134. Коваленко О. Є., Литвин О. В. Застосування цитиколіну у хворих на гіпертонічну дисциркуляторну енцефалопатію та супутній гіпотиреоз. Міжнар. неврологіч. журн. 2013. № 3. С. 111–115.

135. Котвіцька А. А., Лобова І. О. Аналіз споживання нейропротекторних лікарських засобів для лікування ішемічного інсульту в Україні. Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. 2013. № 5. С. 49–58.

136. Котвіцька А. А., Лобова І. О. Оцінка епідеміологічного стану судинно-мозкових захворювань серед населення України та шляхи його покращення. Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. 2013. № 2 (28). С. 74–80.

137. Крилова О. В. Порівняльна фармакокінетика нового потенційного церебропротектора ВІПН-1 на етапі абсорбції в нормі і при церебральній ішемії. Фармац. журн. 2010. № 2. С. 73–77.

138. Крилова О. В. Фармакокінетичний аналіз церебропротекторної дії координаційної сполуки германію з оксиетилідендифосфоною кислотою та пірацетамом : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук. Х., 2010. 20 с.

139. Кузнецов І. Е. Аналіз асортименту та економічної доступності нейропротекторів на фармацевтичному ринку України. Клінічна фармація. 2014. Т. 18, № 1. С. 39–44.

140. Куровська В. О. Оксид азоту та експериментальна ішемія головного мозку. Експерим. та клінічна фізіологія і біохімія. 2011. № 4. С. 13–19.

141. Куровська В. О., Тимофійчук І. Р. Оксид азоту та ферменти антиоксидантного захисту при ішемії головного мозку. Львівський мед. часопис. 2011. Т. 17, № 1. С. 72–76.

142. Куровська В. О., Тимофійчук І. Р. NO- залежні механізми змін протеолітичної активності в гіперкампі щурів за умов ішемії-реперфузії головного мозку. Львівський мед. часопис. 2009. № 4. С. 117–121.

143. Куровська В. О., Тимофійчук І. Р. Перекисне окиснення ліпідів у гіпокампі щурів за умов ішемії - реперфузії головного мозку та уведення L-аргініну. Буков. мед. вісник. 2010. № 1. С. 124–127.

144. Кучеренко Л. И., Беленичев И. Ф., Бухтиярова Н. В. Red/Oxi-зависимые механизмы нейроапоптоза при депривации системного уровня восстановленного глутатиона *in vitro*. HSP₇₀ - опосредованные нейропротективные свойства тиольного антиоксиданта «Ангиолин». Тез. докл. Междунар. конф. «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты». М. ; Новосибирск, 2013. С. 272.

145. Лазаренко А. Современные подходы к использованию нейропротекторов. Здоров'я України. 2012. № 4 (Неврологія. Психіатрія. Психотерапія). С. 40–41.

146. Ларіонов В. Б., Овчаренко Н. В., Головенко М. Я. Порівняльна характеристика кінетики надходження масляної та γ -аміномасляної кислот до головного мозку мишей. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 2. С. 10–15.

147. Ливанов Г. А. Механизм нейропротекторного эффекта метаболического антигипоксанта реамберина у больных с

токсикогипоксической энцефалопатией. Эксперим. и клинич. фармакология. 2012. Т. 75, № 1. С. 34–38.

148. Лизогуб Н. В. Влияние комплексанейропротекторов и антиоксидантов на состояние сознания при делириозном синдроме на фоне эндогенной интоксикации. Медицина неотложных состояний. 2011. № 5. С. 79–81.

149. Лисицкий, Д.С. Фармакологическая коррекция нейротоксических поражений у белых крыс после тяжёлой формы острой алкогольной интоксикации / Д.С. Лисицкий, А.Н. Петров, М.К. Шевчук // Токсикологический вестник. – 2013. – № 1. – С. 19-23.

150. Лукашева Е. В. Исследование основных фармакокинетических параметров L-лизин- α -оксидазы. Вопр. биологич., мед. и фармац. химии. 2013. № 1. С. 57–62.

151. Луцкий М. А. Анализ эффективности мексидола в комплексном лечении больных с ишемическим инсультом. Инсульт. 2010. Т. 110, № 4. С. 57–59.

152. Луцкий М. А., Фролов В. М., Бочарникова Н. М. Некоторые особенности этиологии и патогенеза ишемического инсульта. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2011. Т. 10, № 3. С. 652–655.

153. Львова Л. Ишемический инсульт и нейропротекторы "многовекторного" действия. Фармацевт-практик. 2014. № 11. С. 16–17.

154. Любимова А. В. Применение фенотропила при вертебрально-базиллярной недостаточности. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013. Т. 113, № 12. С. 94–96.

155. Лянг О. В., Кочетов А. Г. Применение мексидола при ишемии головного мозга. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013. Т. 113, № 12. С. 126–129.

156. Маджидова Е. Н., Усманова Д. Д. Эффективность кортексина в коррекции когнитивных расстройств у пациентов с хронической ишемией мозга. Міжнар. неврологіч. журн. 2012. №4 (50). С. 48–50.

157. Мазур Н.А. Дисфункция эндотелия, монооксид азота и ишемическая болезнь сердца. Терапевт. арх. 2003. Т. 75, № 3. С. 84–86.

158. Маслов Л. Н., Халиулин И. Г., Подоксенов Ю. К. Нейропротекторный и кардиопротекторный эффекты гипотермического прекондиционирования. Патологич. физиология и эксперим. терапия. 2012. № 1. С. 67–72.

159. Мембранотропное действие фармакологических средств / А. И. Вислобоков, Ю. Д. Игнатов, П. А. Галенко-Ярошевский, П. Д. Шабанов. Краснодар : Просвещение Юг, 2010. 528 с.

160. Метаболитотропные препараты / И. А. Мазур и др. Запорожье, 2007. 304 с.

161. Метаболические кардиопротекторы / В. А. Визир, Н. А. Волошин, И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев. Запорожье, 2006. 34 с.

162. Минко А. И., Линский И. В. Эффективность и безопасность препаратаноофен500 в лечении больных, зависимых от алкоголя. Укр. вісник психоневрології. 2013. Т. 21, № 4. С. 133–138.

163. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М. : ФГБУ НЦЭСМП, 2012. Ч. 1. 944 с.

164. Михайловский Я. М. Фармакологическая коррекция митохондриальной дисфункции как приоритетное звено нейропротекции. Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015 : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених і студентів з міжнар. участю, присвяч. Дню науки, 14-15 трав. 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 26–27.

165. Михалойко О.Я. Порівняльна характеристика ефективності нейропротекторів у ході терапії ішемічного інсульту у вертебро-базиллярному басейні. Вісник наук. досліджень. 2011. № 4. С. 116–118.

166. Михалойко О. Я., Герасимчук Р. Д. Впливнейропротекторної терапії на рівень гіпергомоцистеїнемії при ішемічному інсульті. Галиц. лікар. вісн. 2011. Т. 18, № 2. С. 71–72.

167. Михеев О. Пьянство и алкоголизм в Финляндии: [программы лечения алкоголизма с участием частных фирм и государства]. Вопр. соц. обеспечения. 2010. № 11. С. 34.

168. Міщенко Т. С., Міщенко В. М., Здесенко І. В. Ефективність препаратуТіоцетам® у хворих із лакунарними інфарктами головного мозку. Міжнар. неврологіч. журн. 2013. № 8. С. 37–44.

169. Молекулярно-биохимические механизмы активации энергетического и пластического обмена в митохондриях и цитозоле при острой церебральной ишемии в эксперименте / Ю. М. Колесник и др. Доп. НАН України. 2012. № 3. С. 174–178.

170. Молекулярные механизмы воздействия аминокислот в составе церебролизина на нейротрансмиссию. Нейротрофические и нейропротективные эффекты аминокислот / О. А. Громова и др. Трудный пациент. 2010. № 2. С. 25–31.

171. Моргунцова С. А. Нейропротективное действие нейротрофическогоцеребропротектора Цереброкурин в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения. Запорож. мед. журн. 2014. № 5. С. 36–40.

172. Моргунцова С. А., Беленічев І. Ф., Абрамов А. В. Вплив похідного тіохіназоліну NC-224 на морфофункціональні характеристики нейронів сенсомоторної зони кори головного мозку у щурів з необоротною білатеральною оклюзією загальних сонних артерій. Досягнення біології та медицини. 2009. № 2 (14). С. 67–70.

173. Морозова О. Г. Ноотропы в комплексной терапии хронической церебральной ишемии: механизмы воздействия и терапевтические возможности прамирацетама. Міжнар. неврологіч. журн. 2013. № 5. С. 143–148.

174. Нейропротективна активність S-похідних 1,2,4-тріазолу / Р. О. Щербина та ін. Запорозж. мед. журн. 2011. Т. 13, № 1. С. 94–97.

175. Нейропротективны́е и эндотелиотропны́е свойства нового препарата лизиний в условиях ишемического повреждения головного мозга / И. Ф. Беленичев и др. Патологія. 2012. № 3. С. 120–121.

176. Нейропротекторна терапія гострого інфаркту мозку: сучасний вимір/ І. С.Зозуля, В. В.Ніконов, Т. В.Мироненко, А. І. Зозуля.Укр. вісник психоневрології. 2012.Т.20, № 3.С.99–100.

177. Нейропротекторний вплив дигоксину на моделі ішемічного інсульту в щурів / А. В. Паєнок та ін.Вісник наук. досліджень. 2010. № 1. С. 84–87.

178. Нейропротекторный эффект рекомбинантного эритропоэтина человека, сорбированного на полимерных наночастицах, на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (модель геморрагического инсульта) / В. Ю. Балабаньян и др.Эксперим. и клинич. фармакология. 2011. Т.74, № 10.С. 17–22.

179. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев и др. К. : Логос, 2015. 512 с.

180. Нейротропное действие соевоголецитина в процессе формирования когнитивной функции у белых крыс / А. Л. Дроздов и др. Мед. перспективы. 2015.Т. 20, № 1. С. 4–9.

181. Нитрозирующий стресс в головном мозге пренатально алкоголизированных крыс: эффекты тиоцетама / И. Ф. Беленичев и др. Патологія. 2012. № 3. С. 121.

182. Нові можливості фармакологічної корекції ренін-ангіотензинової системи при цереброваскулярній патології за рахунок інтраназального транспорту діючої субстанції еналаприлу малеату / І. Л. Кечин та ін. Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики. 2013. № 1. С. 28–30.

183. Носач С. Г. Поиск соединений с нейропротективными свойствами среди производных ксантина. Сучасні аспекти медицини і

фармації - 2015 : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених і студентів з міжнар. участю, присвяч. Дню науки, 14-15 трав. 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 31.

184. Однокоз Е. В., Беленичев И. Ф. Антиоксидантное действие белков теплового шока HSP70 в условиях острой церебральной ишемии. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 5. С. 228.

185. Окислительная модификация белка у новорожденных и младенцев, оперированных в условиях многокомпонентных анестезий с центральными нейроаксиальными блокадами / М. Ю. Курочкин и др. Медицина неотложных состояний. 2012. № 2. С. 54–56.

186. Ольшанская А. В. Некоторые аспекты нейропротективного действия селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов (SERM) при моделировании церебральной ишемии. Сучасні аспекти медицини і фармації - 2015 : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених і студентів з міжнар. участю, присвяч. Дню науки, 14-15 трав. 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 31–32.

187. Опыт применения фенотропила при лечении амбулаторных больных в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта / Л. В. Багирь и др. Судинні захворювання головного мозку. 2007. № 6. С. 49–55.

188. Орлова А. С. Соматические расстройства и свободнорадикальные процессы при цереброваскулярной болезни. Фундаментальные исследования. 2012. № 8. С. 220–224.

189. Основные причины и распространенность хронических болевых синдромов среди неврологических больных / С.Х.Яхъев, Е.А.С.Хадж, И.Н.Долгова, С.М. Карпов. Междунар. науч.-исслед. журн. 2013. №10-5(17). С. 39.

190. Особливості перебігу астено-вегетативних та когнітивних розладів у віддаленому періоді закритої черепно-мозгової травми при застосуванні різних ноотропних препаратів / А. В. Ткачов та ін. Новости медицины и фармации. 2011. № 17. С. 3–4.

191. Осыченко А.С., Донника А.Д. Особенности статистических данных отравлений алкоголем. *Adv. Curr. Nat. Sci.* 2011. № 8. С. 128–130.

192. Оценка эффективности препарата Вазопро® в качестве антиоксидантной терапии при хронической ишемии головного мозга / А. В. Демченко и др. *Міжнар. неврологіч. журн.* 2012. № 7. С. 31–37.

193. Оценка эффективности применения мексидола в сочетании с тромболитической терапией у больных с ишемическим инсультом / Ж. Ю. Чефранова и др. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2012. Т. 112, № 4. С. 49–52.

194. Оцінка церебропротекторної дії похідних (3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]тріазино [2,3-с] хіназолін-6-іл) карбонових кислот на моделі гострого порушення мозкового кровообігу в щурів / Г. І. Степанюк та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2011. № 6. С. 22–26.

195. Павличенко В. Д. NO - синтазная активность в головном мозге спонтанно гипертензивированных крыс. Моделирующее действие нового препарата «МТ». *Сучасні аспекти медицини і фармації - 2015 : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. Молодих вчених і студентів з міжнар. участю, присвяч. Дню науки, 14-15 трав. 2015 р. Запоріжжя, 2015.* С. 33.

196. Павлов С. В. Влияние нейропептидных препаратов на показатели энергетического метаболизма в головном мозге крыс с экспериментальной острой ишемией. *Загальна патологія та патологічна фізіологія.* 2011. Т. 6, № 4. С. 84–89.

197. Павлов С. В. Влияние Цереброкурина на содержание HSP 70 белка в ткани мозга крыс в условиях моделирования церебральной ишемии. *Перспективи медицини та біології.* 2012. Т. IV, № 2. С. 95–98.

198. Павлов С. В. Вплив тіольних антиоксидантів на вміст стрес-білка HSP 70 у гіпокампі монгольських піщанок з гострою ішемією головного мозку. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2012. № 1 (26). С. 15–18.

199. Павлов С. В. Вплив тіольних антиоксидантів на розвиток мітохондріальної дисфункції при моделюванні гострої ішемії головного мозку. Здобутки клінічної і експерим. медицини. 2013. № 1 (18). С. 112–115.

200. Павлюк И. В. Молекулярные аспекты нейропротективного действия нового препарата «Ангиолин» при формировании хронической алкогольной интоксикации у крыс. Збірка тез Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю «Сучасні аспекти медицини і фармації - 2014». Запоріжжя, 2014. С. 29–30.

201. Паєнок А. В. Нейропротекторний вплив дигоксинуна моделі ішемічного інсульту в щурів. Вісник. наук. досліджень. 2010. № 1. С. 84–87.

202. Пантогам при лечении больных с органическим поражением головного мозга различного генеза / Т. А. Рогачева и др. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 110, № 10. С. 34–39.

203. Параметри фармакокінетики таблеток «Ангіолін» у крові щурів після перорального введення / О. К. Ярош, О. О. Нагорна, Л. І. Кучеренко, О. С. Бідненко. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2014. № 2 (38). С. 64–69.

204. Пат. 106867 Україна. МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р 25/28 (2006.01), А61Р 25/32 (2006.01). Спосіб корекції неврологічних порушень при хронічній алкогольній інтоксикації / І. В. Павлюк та ін. ; заявник і патентовласник ТОВ НВО «Фарматрон». № а201407033 ; заявл. 23.06.14 ; опубл. 10.10.14.

205. Пат. 2370492 Рос. Федерация. МПК С 07 D 413/00 (2006.01). Лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат, проявляющий нейропротективное, ноотропное, кардиопротективное, эндотелиотропное, противоишемическое, антиоксидантное, противовоспалительное и противогипоксическое действие, обладающий низкой токсичностью / И. А. Мазур и др. ; заявитель и патентообладатель ООО НПО «Фарматрон». № 2007121014 ; заявл. 04.06.07 ; опубл. 20.10.09, Бюл. 29.

206. Пат. 2430728 Рос. Федерация. МПК С07D249/08 (2006.01) С07С229/26 (2006.01) А61К31/4196 (2006.01). Способ получения (S)-2,6-диаминогексановой кислоты 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоцетата / И. А. Мазур, Л. И. Кучеренко, Е. Е. Калашникова, Н. А. Авраменко ; заявитель и патентообладатель ООО НПО «Фарматрон». № 2012123339 ; заявл. 05.06.12, опубл. 20.10.13.

207. Пат. 59061 Україна. МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61К 9/00, А61Р 9/00, А61Р 9/10 (2006.01), А61Р 25/28 (2006.01), С07D 249/08 (2006.01). Лікарський засіб для лікування захворювань серцево-судинної та нервової системи, який проявляє протиішемічну, ендотеліопротективну, антиоксидантну, протигіпоксичну, протизапальну дію / І. А. Мазур та ін. ; заявник і патентовласник ТОВ НВО «Фарматрон». № а201015964 ; заявл. 30.12.10 ; опубл. 10.05.11.

208. Пат. 86668 Україна. МПК С 07 D 249/08 (2009.01), А 61 К 31/4196, А 61 Р 9/00, А 61 Р 9/10 (2009.01), А 61 Р 25/28 (2009.01). Лізіній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат / І. А. Мазур та ін. ; заявник і патентовласник ТОВ НВО «Фарматрон». № а200705865 ; заявл. 25.05.07 ; опубл. 12.05.09, Бюл. 9.

209. Пат. 99584 Україна. МПК С07D 249/08 (2006.01), А61К 31/4196 (2006.01). Спосіб одержання (S)-2.6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату / І. А. Мазур, Л. І. Кучеренко, О. Є. Калашнікова, М. О. Авраменко ; заявник і патентовласник ТОВ НВО «Фарматрон». № а201205360 ; заявл. 03.05.12 ; опубл. 27.08.12.

210. Петров В.М. Влияние алкоголя на морфо-функциональные изменения в организме и их коррекция в условиях низко- и высокогорья (экспериментальное исследование) :автореф. дис. на соискание ученой степени канд.мед.наук. Бишкек, 2012. 19 с.

211. Пішак В. П., Куровська В. О.Взаємозв'язок моно оксиду нітрогену та метаболізму глюкози як напрям нейропротекції за ішемічних

ушкоджень головного мозку. Клінічна фізіологія та біохімія. 2012. № 4. С. 53–58.

212. Поліпшення функціонального відновлення та регенерації нервів, зменшення зони рубцювання після операцій на периферичних нервах у щурів на тлі застосування цитиколіну / R. Ozay et al. Укр. неврологіч. журн. 2012. № 2. С. 79–83.

213. Попов Н. Н., Оленич В. Б., Савво А. Н. Новые подходы к нейропротекторной терапии синдрома вегетативной дисфункции у детей с перинатальным поражением центральной нервной системы. Міжнар. неврологіч. журн. 2015. № 1. С. 81–86.

214. Порівняльний аналіз впливу таурину і пірацетаму на морфологічні зміни головного мозку щурів при циркуляторній гіпоксії / Ю. М. Колесник та ін. Доп. НАН України. 2012. № 8. С. 160–165.

215. Похідні ксантину -перспективні нейропротектори з антиоксидантним механізмом дії / К. В. Александрова та ін. Патологія. 2012. № 3. С. 119.

216. Пошук нейропротекторів з енерготропними властивостями в ряду похідних ксантину / К. В. Александрова та ін. Мед. хімія. 2014. Т. 16, № 4. С. 85–88.

217. Применение метода нейросетевого моделирования для исследования эффективности нейропротекторов в острейшем периоде мозгового инсульта / Ю. А. Батман, О. Л. Антонова, Е. А. Стрюковская, В. В. Павлюченко. Університетська клініка. 2011. Т. 7, № 1. С. 100–103.

218. Применение пантогама актив в комплексном лечении дистонических гиперкинезов / Е. А. Катунина и др. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 110, № 11, вып. 2 : В помощь практич. врачу. С. 57–61.

219. Проблемы профилактики и лечения алкоголизма. Вопр. соц. обеспечения. 2010. № 12. С. 5–6.

220. Прокопів М. М. Роль нейропротекторної терапії у відновленні неврологічних функцій у хворих з гострим ішемічним інсультом. Укр. неврологіч. журн. 2013. № 3. С. 45–54.

221. Профилактический и лечебный нейропротективные эффекты таблеток Ангиолин при курсовом введении животным с хронической алкогольной интоксикацией./ Павлюк И.В., Мазур И.А., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Винниченко Т.Ю. //V Національний з'їзд фармакологів України. Тези доповідей м. Запоріжжя 18-20 жовтня 2017. С. 84.

222. Прохорова М. И. Современные методы в биохимии (углеводный и энергетический обмен). Л. : Изд-во ЛГУ, 1986. 368 с.

223. Пахомова А., Говоруха Т., Решетнік Є., Макарчук М. Влив кверцетину на умовну реакцію в Т-подібному лабіринте та на рівень перекисного окислення ліпідів в мозку та печенці алкоголізованих щурів //Біологія.-2009.-№54.-С.53-56

224. Пулик О. Р. Ефективність цитиколіну у лікуванні хворих з цереброваскулярними захворюваннями. Consilium medicum Ukraina. 2010. Т. 4, № 10. С. 26–28.

225. Путилина М. В. Комбинированная нейропротекторная терапия острых нарушений мозгового кровообращения. Укр. журн. екстремальної медицини імені Г.О. Можаяєва. 2011. Т. 12, № 3. С. 112–121.

226. Путилина М.В. Комбинированная нейропротекторная терапия при цереброваскулярных заболеваниях. Врач. 2012. № 4. С. 69–73.

227. Радучич О. Нейропротекторная терапия пациентов с инсультом: защита главное. Здоров'я України. 2011. № 7. С. 3–4.

228. Рахимбаева Г. С., Саидвалиев Ф. С., Умаров Р. Р. Применение противоотечного препарата L-лизина эсцината в острый период ишемического инсульта и его вторичные гемодинамические эффекты. Укр. мед. часопис. 2013. № 4. С. 59–62.

229. Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленичев и др. Донецк : Издат. Дом Заславский, 2009. 261 с.

230. Рикало Н. А., Яровенко Л. О. Особливості репаративної регенерації тканини печінки у щурів при експериментальному тетрахлорметановому та алкогольному гепатиті. Патологія. 2015. № 1. С. 84–89.

231. Роль нитрозирующего стресса в механизмах нейродеструкции в условиях пренатальной алкогольной интоксикации и пути фармакокоррекции возникающих нарушений / А. Н.Егоров,И. Ф.Беленичев, Е. П.Соколик, Л. И. Кучеренко. Запорож. мед. журн. 2012. № 5. С.25–28.

232. Савустьяненко А. В. Церебролизин: полный спектрнейропротекторной активности (обзор исследований). Міжнар. неврологіч. журн. 2010. № 3. С. 165–171.

233. Семенова М. О., Мамчур В. Й. Оцінка залежності ступеня відновлення мнестичних процесів та поведінкових реакцій від антигіпоксичних та антиоксидантних властивостей сучаснихноотропів. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2011. № 2. С. 19–23.

234. Семенова М. О., Мамчур В. Й., Кучеренко Л. І. Характер відновлення мнестичних процесів і поведінки після гострої гіпобаричної гіпоксії в умовах 10-денного введення ноотропів. Запорож. мед. журн. 2011. Т. 13, № 3. С. 40–43.

235. СереденинС.Б. Исследование нейропротекторного действия дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при индукции экспериментальной фокальной ишемии в бассейне средней мозговой артерии. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2011. Т. 151,№ 5. С. 518–521.

236. Серцева тканнна біодоступність та показники розрахункової фармакокінетики нової кардіотропної сполуки «Лізиній» / Л. І. Кучеренко та ін. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2012. № 5 (30). С. 37–43.

237. Скринінг церебропротекторного ефекту серед нових похідних адамантану в умовах експериментальної ішемії головного мозку / О. А. Ходаківський, Г. І. Степанюк, Ю. В. Короткий, М. О. Лозинський. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2010. № 3. С. 8–11.

238. Скринінг церебропротекторної дії серед нових похідних 1,2,4-триазино-хіназоліну в умовах гострої експериментальної ішемії головного мозку / Г. І. Степанюк, Л. І. Маринич, Г. Г. Берест, С. І. Коваленко. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2010. № 1/2. С. 75–78.

239. Слесарчук В. Ю. Нейропротекторные свойства препаратов кверцетина. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2014. № 6. С. 11–18.

240. Слободин Т. Н. Нейропротекторное действие агонистов дофаминовых рецепторов на примере прамипексола при лечении больных болезнью Паркинсона. Патологія. 2010. Т. 7, № 2. С. 38–40.

241. Слободянюк П. М. Клінічні й психопатологічні особливості формування та перебігу алкогольної залежності у чоловіків в аспекті їх інтегративної психотерапії. Мед. психологія. 2010. Т. 5, № 3(19). С. 84–92.

242. Снижение апоптической гибели нейронов СА-1 зоны гиппокампа крыс в условиях пренатальной хронической алкоголизации и на фоне введения цереброкурина и тиоцетама / А. Н. Егоров и др. Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. 2012. Т. 8, № 2. С. 145–149.

243. Создание метаболитотронных эндотелиопротекторов - фокус на «Ангиолин» / Парнюк Н.В., Павлюк И.В., Беленичева О.И. // Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» 3-5 июня Москва 2013 г. С. 13.

244. Соколик Е. П., Беленичев И. Ф. Фармакологическая модуляция системы окиси азота при моделировании хронической алкогольной интоксикации у крыс. Запорож. мед. журн. 2012. Экспериментальная и клиническая фармакологія 2011. Т. 74 (10). С. 43-45.

245. Соколик Е. П., Стеценко В. А. Фармакологическая модуляция HSP70-зависимых механизмов эндогенной нейропротекции в условиях пренатальной хронической алкоголизации цереброкурином и тиоцетамом. Молодые ученые - медицине : материалы XIV науч. конф. молодых ученых и специалистов, 21-23 мая 2015 г. Владикавказ, 2015. С. 221–226.

246. Состояние тиол-дисульфидного равновесия и системы оксида азота в тканях головного мозга крыс с аллоксановым диабетом в условиях терапии ноотропами / В. И.Жилюк, В. И.Мамчур, С. В.Павлов, Н. В. Бухтиярова. Вісник психіатрії та психофармакотерапії. 2010. № 1 (17). С. 77–83.

247. Спосіб корекції неврологічних порушень при хронічній алкогольній інтоксикації. / Павлюк І.В., Беленічев І.Ф., Нагорна О.О., Кучеренко Л.І., Авраменко М.О., Мазур І.А. // Патент на винахід 10867 Україна. МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01), Заявник ТОВ НВО «Фарматрон». - № а 2014 07033; Дата подання 23.06.2014; Опубл. 10.10.2014

248. Сравнительная оценка нейропротективного действия производных L-лизина в условиях острой алкогольной интоксикации / Беленічев І.Ф., Кучеренко Л.І., Павлюк І.В., // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал. Випуск 4, том 1(133), 2016 С.117-122.

249. Стеценко В., Єгоров О. Вплив цереброкуруину та тіоцетаму на апоптотичну загибель нейронів СА-1 зони гіпокампу в умовах пренатальної алкогольної інтоксикації. Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. 2013. № 2 (додаток). С. 36.

250. Супрун А. С. Соотношение показателей системы глутатиона, энергетического метаболизма и окислительной модификации белков в клетках головного мозга крыс на фоне экспериментальной гипергликемии. Клінічна та експерим. патологія. 2014. Т.13, № 1.С.129–135.

251. Сучасний погляд на ідею використання гамма-аміномасляної кислоти та її метаболіта для відновлення моторної функції / О. Г. Родинський, Т. В. Демченко, О. В. Мозгунов, К. В. Писаревська. Патологія. 2015. № 3. С. 4–9.

252. Терапія новонароджених згіпоксично-ішемічним пошкодженням ЦНС при застосуванні комплексної терапії з використанням цитиколіну / О. І.Ізюмець та ін. Перинатология и педиатрия. 2010. № 1. С. 97–100.

253. Тиол-дисульфидное равновесие-определяющий фактор резистентности нейроновкнитрозирующему стрессувусловиях ишемии мозга : (обзор лит.) / Ю. М. Колесник и др. Журн. НАМН України. 2013. Т. 19, № 1.С. 3–11.

254. Тиотриазолин, тиодарон в лечении сердечно-сосудистой патологии / И. А.Мазур, Н. А.Волошин, В. А.Визир, И. Ф. Беленичев. Запорожье : Печатный мир, 2011. 303 с.

255. Тиотриазолин: фармакологические аспекты и клиническое применение / И. А. Мазур и др. Запорожье : ЗГМУ ; Л. : Наутилус, 2005. 156 с.

256. Тиоцетам в комплексной терапии хронической ишемии мозга / В. И. Боброва, Ю. М. Колесник, И. Ф. Беленичев, А. В. Демченко. Запорож. мед. журн. 2010. Т. 12, №5. С. 130–135.

257. Тихоновський О. В. Похідні ГАМА-аміномасляної кислоти як засіб фармакологічної корекції експериментальної ішемії головного мозку : навч. посібник для студ. мед. ф-тів. Запоріжжя, 2000. 20 с.

258. Тогузов Р. Т. Элементный составнейропротекторовприродного происхождения. Новости медицины и фармации. 2010.№ 316. С. 38–40.

259. Уханова Т. А., Новикова Е. Е., Дементьева Е. В. Микротоковая рефлексотерапия в сочетании снейропротектором в реабилитации больных с детским церебральным параличом. Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физкультуры. 2012. № 5. С. 33–36.

260. Фармакокорекция последствий нейротоксических поражений при тяжелых формах острых отравлений этанолом / Павлюк И.В., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Абрамов А.В. // «Світ медицини та біології» № 4 (58) 2016 С.93-98.

261. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М. : ОАО «Изд-во «Медицина», 2005.832 с.

262. Чекман І. С. Фармакофори: створення лікарських засобів : (огляд літ. та власних досліджень). Журн. АМН України. 2010. Т. 16, № 3. С. 424–437.

263. Черний В. И. Коррекция холинергической недостаточности как направление нейропротекторной терапии у пациентов, перенесших мозговой инсульт. Здоров'я України. 2012. № 2 (Неврологія. Психіатрія. Психотерапія). С. 32–33.

264. Черний В. И. Применение нейропротекторов методом экстракорпоральной фармакотерапии в остром периоде ишемического инсульта. Медицина неотложных состояний. 2012. № 7/8. С. 109–118.

265. Черний Т. В. Исследование эффективности нейропротекторов при острой церебральной недостаточности с применением метода нейросетевого моделирования. Міжнар. неврологіч. журн. 2012. № 2. С. 124–132.

266. Черний Т. В. Применение метода нейросетевого моделирования для исследования эффективности нейропротекторов в острейшем периоде мозгового инсульта и при тяжелой черепно-мозговой травме. Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. 2011. № 4. С. 52–56.

267. Черний Т. В. Разработка метода прогнозирования исхода течения тяжелой черепно-мозговой травмы и метода оценки эффективности лечения ЧМТ с применением церебропротекторов. Укр. журн. екстремальної медицини ім. Г.О. Можаяєва. 2009. Т. 10, № 3. С. 110–117.

268. Шевага В. М., Задорожна Б. В. Спосіб терапії гострого періоду струсу головного мозку із застосуванням препарату "Фенібут" (Ноофен) : інформ. лист. К., 2004. 2 с.

269. Шевцов П.Н., Шевцова Е.Ф., Бурбаева Г.Ш. Влияние такрина, амиридина, акатинола мемантина и триазолама на фосфорилирование, структуру и сборку микротрубочек из микротубулярных белков мозга при

болезни Альцгеймера. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2008. Т. 145, № 2. С. 178–182.

270. Шепотинник Е. В. Применение цитиколина как нейротектора в потенцировании эффекта тромболитической терапии. Міжнар. неврологіч. журн. 2012. № 4. С. 26–28.

271. Щокіна К. Г., Штриголь С. Ю., Іщенко О. М. Церебропротекторні властивості рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на моделі закритої черепно-мозкової травми. Укр. журн. клініч. та лаб. медицини. 2010. Т. 5, № 3. С. 137–140.

272. Экспрессия васкулоэндотелиального фактора роста и характеристика эндотелиоцитов сосудов головного мозга животных с церебральной ишемией: Фармакологические эффекты нового метаболитропного препарата Лизиний / Ю. М. Колесник и др. Патология. 2011. Т. 8, № 2. С. 89–95.

273. Эффективность нейропротекции у больных с хроническими цереброваскулярными заболеваниями / Д. Ю. Бархатов и др. Міжнар. неврологіч. журн. 2011. № 7 (45). С. 37–42.

274. Эффективность применения Ноофена для коррекции вегетативных дисфункций у подростков с церебральными ангиодистониями и моторными расстройствами / А. Н. Стоянов и др. Укр. вісн. психоневрології. 2012. Т. 20, № 4. С. 114–119.

275. Юнцев С. В. Исследование спектра нейропротекторного действия ингибитора АПФ. Эксперим. и клинич. фармакология. 2010. Т. 73, прил. (5-я Междунар. конф. "Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам"). С. 98.

276. Юрченко Д. М., Носач С. Г. Цілеспрямований пошук сполук-нейропротекторів серед похідних 7-ацетатних та ксантиніл-8-тіоацетатних кислот. Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики. 2012. № 2 (додаток). С. 231.

277. Яковлева І.Ю., Беленічев І. Ф. Мітопротекторний механізм нейропротекторної дії яктону в умовах експериментальної церебральної ішемії. Вісн. проблем біології і медицини. 2010. Вип. 2. С. 147–150.

278. Яковлева Л. В., Міщенко О. Я., Адонкіна В. Ю. Обґрунтування клініко-економічних переваг комплексної нейропротекторної терапії з використанням цитиколіну та актовегіну у порівнянні з базисною та терапією цитиколіном за результатами фармакоеконічного аналізу : інформ. лист №368-2012, вип. 52 з пробл. «Фармація». К., 2012. 4 с.

279. Яковлева Л. В., Рибка А. В. Церебропротекція в аспекті доказової медицини: церебrolізін та пірацетам. Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. 2013. № 5. С. 59–65.

280. Яснецов В. В., Воронина Т. А. Исследование противогипоксических и антиамнестических свойств мексидола и семакса. Эксперим. и клинич. фармакология. 2010. Т. 73, № 4. С. 2–7.

281. 5-hydroxytryptamine_{1A} (5-HT_{1A}) receptor agonists: A decade of empirical evidence supports their use as an efficacious therapeutic strategy for brain trauma / Jeffrey P. Cheng et al. Brain Res. 2016. Vol. 1640, pt. A. P. 5–14.

282. A bout analysis reveals age-related methylmercury neurotoxicity and nimodipine neuroprotection/ A. N. Shen et al. Behav. Brain Res. 2016. Vol. 311. P. 147–159.

283. Acute toxicity and anticonvulsant activity of liposomes containing nimodipine on pilocarpine-induced seizures in mice / L. C. Gayoso et al. Neurosci. Lett. 2015. Vol. 585. P. 38–42.

284. Aengevaeren W. R. Beyond lipids the role of the endothelium in coronary artery disease. Atherosclerosis. 2009. Vol. 147, N 1. P. 11–16.

285. Agmon A., Connors B. W. Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. Neurosci. 1991. Vol. 41, issues 2-3. P. 365–379.

286. Alcohol use and addiction services in Ukraine / A. V. Samokhvalov et al. Int. Psychiatry. 2009. Vol. 6, N 1. P. 5–7.

287. Ammendola A., Gemini D., Iannacone S. Gender and peripheral neuropathy in chronic alcoholism: A clinical-electroneurographic study. *Alcohol Alcohol.* 2010. Vol. 35. P. 368–371.

288. An efficient synthesis of a novel analog of octreotide with an unnatural-lysine-like tetrazolyl amino acid / E. A. Popova, S. K. Nikolskaia, I. A. Gluzdikov, R. E. Trifonov. *Tetrahedron Let.* 2014. Vol. 55, issue 36. P. 5041–5046.

289. Antioxidant Modulation of NO-Dependent Mechanisms of Oxidative Stress Initiation in Brain of Rats Subjected to Chronic Alcohol Intoxication / Беленичев И.Ф., Павлюк И.В., Кучеренко Л.И. // *Biological Markers Guided Therapy*, Vol/ 3, 2016 no/ 1, 177 -184 HIKARI Ltd

290. Aviram M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular disease. *Free Radic. Res.* 2012. Vol. 33. P. 85–95.

291. Belenichev I. F., Abramov A. V. Pharmacological modulation of apoptosis signaling in neurons of CA1-zone of hippocampus of rats with chronic alcohol intoxication. *Innovat. J. Med. Health Sci.* 2011. Vol. 1, N 1. P. 12–16.

292. Belenichev I. F., Gorbacheva S. V., Bukhtiyarova N. V. The Thiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs. *Neurochem. J.* 2014. Vol. 8, N 1. P. 24–27.

293. Belenichev I. F., Kolesnik Yu. M., Bukhtiyarova N. V. Disturbance of HSP70 Chaperone Activity is a possible mechanism of Mitochondrial Dysfunction. *Neurochem. J.* 2011. Vol. 5, N 4. P. 251–256.

294. Belenichev I. F., Mazur I. A., Bukhtiyarova N. V. The Endothelium - Protective Effect of 3-Methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate(S)-2,6-diaminohexanoic Acid (Lysinium): Effects on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and the Characteristics of the Endotheliocytes of the Cerebral Vessels of Animals with Cerebral Ischemia. *Neurochem. J.* 2013. Vol. 7, N 4. P. 296–303.

295. Belenichev I. F., Odnokoz E. N., Gorbacheva S. V. The study of possible influence of reduced glutathione on regulation apoptosis in neuron of cerebral cortex. ESF-EMBO Symp. "Glutathione and Related Thiols in Living Cells", 4-9 Sept. 2011. Sant Feliu de Guixols, 2011. P. 211.

296. Belenichev I. F., Sokolik E. P., Eugorov A. N. Reduction of apoptotic death of neurons CA-1 zone of hippocampus of rats in the condition of prenatal chronic alcoholisation by cerebrocurin and tiocetam. *Elixir Int. J. Elixir Pharmacy*. 2013. N 65 A.P. 20005–20008.

297. Belenichev I. F., Sokolik E. P. Nitrozone Stress and Neurological Disorders in Experimental Alcohol Intoxication and Their Pharmacological Correction by Neuropeptides. *Inventi Rapid: Mol. Pharmacol.* 2011. Vol. 2011, issue 4. P. 11–18.

298. Belenichev I., Sokolik E. Nitrozone stress and neurological disorders in experimental alcohol intoxication and their pharmacological correction by neuropeptides. *Mol. Pharmacol.* 2011. Vol. 11, N 4. P. 12–17.

299. Beta2-adrenergic activity modulates vascular tone regulation in lecithin: cholesterol acyltransferase knockout mice / S. Manzini et al. *Vascular Pharmacol.* 2015. Vol. 74. P. 114–121.

300. Cabrera C. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 206. P. 77–81.

301. Carnitine transport into muscular cells. Inhibition of transport and cell growth mildronate / B. Georges et al. *Biochem. Pharmacol.* 2011. Vol. 59, N 11. P. 1357–1363.

302. Chapter One - Neuropeptides, Trophic Factors, and Other Substances Providing Morphofunctional and Metabolic Protection in Experimental Models of Diabetic Retinopathy / K. Szabadfi, E. Pinter, D. Reglodi, R. Gabriel. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2014. Vol. 311. P. 1–121.

303. Citicoline for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Formal Meta-analysis of Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled

Trials / J. J. Secades et al. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2016. Vol. 25 (8). P. 1984–1996.

304. Coronary endothelial dysfunction increases the severity of ischaemia-induced ventricular arrhythmias in rat isolated perfused hearts / Z. F. Hassanabad, B. L. Furman, J. R. Parratt, E. Aughey. *Basic. Res. Cardiol.* 2008. Vol. 93, N 4. P. 241–249.

305. Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation / R. Hambrecht et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000. Vol. 35, N 3. P. 706–713.

306. Cortixinandcombinationofnitritewithcortexindecreaseswellinganddestructionofcerebellarneuronsinhemorrhagicstroke / V. Reutovetal. *NitricOxide.* 2011. Vol. 24, suppl. P. S21.

307. Development of two step liquid-liquid extraction tandem UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of Ginkgo flavonoids, terpene lactones and nimodipine in rat plasma: Application to the pharmacokinetic study of the combination of Ginkgo biloba dispersible tablets and Nimodipine tablets / J. Xiao et al. *J. Chromatogr. B.* 2016. Vol. 1028. P. 33–41.

308. Discovery and SAR of novel series of imidazopyrimidinones and dihydroimidazopyrimidinones as positive allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5) / M. L. Martín-Martín et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015. Vol. 25, issue 6. P. 1310–1317.

309. Effect of l-arginine on the physical properties of choline chloride and glycerol based deep eutectic solvents / F. Chemat, H. J. You, K. Muthukumar, Th. Murugesan. *J. Mol. Liq.* 2015. Vol. 21. P. 605–611.

310. Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of rats colitis induced by acetic acid / J. R. Colares et al. *J. Coloproctol.* 2016. Vol. 36, issue 2. P. 97–103.

311. Effect of Spin Trapping Compound PBN and Thiothiazoline on the Outcome from experimental Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats / I. Belenichev et al. *Mol. Pharmacol.* 2011. Vol. 1, issue 3. P. 90–95.

312. Effects of citicoline used alone and in combination with mild hypothermia on apoptosis induced by focal cerebral ischemia in rats / S. Sahin et al. *J. Clin. Neurosci.* 2010. Vol. 17, issue 2. P. 227–231.

313. Frequency and determinants of lipid testing in ischemic stroke and transient ischemic attack: findings from get with the guidelines-stroke / E. E. Smith et al. *Stroke.* 2010. Vol. 41 (2). P. 232–238.

314. Fulton T., Nixon K. Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 2010. Vol. 44, N2. P. 115–127.

315. Functional nitric oxide conjugate systems state/restored heart thiolsof rats in modeling isadrine-pituitrin's myocardial infarction usingmetabolitotropic cardioprotector "Angiolin"/ I. F.Belenichev et al. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.* 2015. Vol. 4, N 1. P. 1–5.

316. Global status report on alcohol and health - 2015 ed. Geneva : World Health Organization, 2015. 354 p.

317. Growth factors and endothelial dysfunction / C. Bauters, I. Six, T. Meurice, E. Van Belle. *Drugs.* 2009. Vol. 59. P. 11–15.

318. Gualtieri F. Cholinergic receptors and neurodegenerative diseases. *Pharm. Acta Helvet.* 2000. Vol. 74, issues 2-3. P. 85–89.

319. HIF-1a Transcription Factor, HSP₇₀ and resistance of membrane structures to ROS in acute hypoxia and adaptation / T. G. Sazontova, A. G. Zhukova, N. A. Anchishkina, Yu. V. Arkhipenko. *Abstr. VIII Congress of the International Society for Adaptive Medicine, June 21-24 2006. Moscow, 2006. P.42–43.*

320. Horvath D. H., Watson J. B., Travis G. H. Probable exclusion of thecortexin-encoding gene as a candidate for mouse neurological mutants:nervous, totteringandmotor neuron degeneration. *Gene.* 1996.Vol. 171, issue 2. P. 305–306.

321. HSP₇₀ chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling / P. De Los Rios, A. Ben-Zvi, O. Slutsky, A. Azem. *PNAS.* 2006.Vol. 103,N 16.P.112–121.

322. Intra-amygdala microinfusion of neuropeptide S attenuates neuropathic pain and suppresses the response of spinal microglia and astrocytes after spinal nerve ligation in rats/ F. Yang et al. *Peptides*. 2016. Vol. 82. P. 26–34.

323. Klusa V. Atypical 1,4-dihydropyridine derivatives, an approach to neuroprotection and memory enhancement. *Pharmacol. Res.* 2016. Vol. 113 (pt B). P. 754–759.

324. Kotvitska A. A., Lobova I. O. Marketing researches of market of medications of neuroprotective action in Ukraine. *Acta Facultatis Universitatis Comenianae*. 2013. Vol. LX (1). P. 15–20.

325. Lecithin-cholesterol acyltransferase in brain: Does oxidative stress influence the 24-hydroxycholesterol esterification? / V. La Marca et al. *Neurosci. Res.* 2016. Vol. 105. P. 19–27.

326. Levytska O. R., Hromovyk B. P., Basarab M. O. Monitoring of prescribed drugs to the patients with acute cerebrovascular pathology. *Streszczenia. Farmacja polska na tle Unii europejskiej. XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 12-15 września 2010. Gdańsk, 2010. S. 415.*

327. Lievykh A. E., Zhylyuk V. I., Mamchur V. I. Condition of thiol-disulfide and nitric oxide balance in brain tissues of rats with alloxan diabetes treated with neuroprotective drugs. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011. Vol. 21, suppl. 3. P. S282–S283.

328. Manzo-Avalos S., Saavedra-Molina A. Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2010. Vol. 7, N 12. P. 4281–4304.

329. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease / M. Mari, A. Morales, A. Colell, C. García-Ruiz. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1830. P. 3317–3328.

330. Mitochondrial preconditioning: a potential neuroprotective strategy / Correia S. C. et al. *Front Aging. Neurosci.* 2010. Vol. 26, N 2. P. 138.

331. Nefiracetam attenuates post-ischemic nonconvulsive seizures in rats and protects neuronal cell death induced by veratridine and glutamate / Xi-Chun May Lu et al. *Life Sci.* 2013. Vol. 92, issue 22. P. 1055–1063.

332. Nerve growth factor facilitates redistribution of adrenergic and non-adrenergic non-cholinergic perivascular nerves injured by phenol in rat mesenteric resistance arteries / A. Yokomizo et al. *Eur. J. Pharmacol.* 2016. Vol. 770. P. 110–116.

333. Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells combined with nimodipine against radiation-induced brain injury through inhibition of apoptosis / Gui-Hua Wan et al. *Cytotherapy.* 2016. Vol. 18, issue 1. P. 53–64.

334. Neurotensin receptors as modulators of glutamatergic transmission / L. Ferraro et al. *Brain Res. Rev.* 2008. Vol. 58, issue 2. P. 365–373.

335. Odyntsova V. M., Pruglo Ye. S. Synthesis, physical-chemical properties and the study of anti-hypoxemic activity of 5-(adamantine-1-yl)-4-R-1,2,4-triazole-3-thion alkylderivative. *Запорож. мед. журн.* 2015. N 2. С. 93–96.

336. Overgaard K. The effects of citicoline on acute ischemic stroke: a review. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2014. Vol. 23, issue 7. P. 1764–1769.

337. Pharmacological effects on oxidative stress non-dependent mechanisms in the brain under chronic alcohol intoxication: Angiotensin antioxidant effects / Павлюк И.В., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И. // *American Scientific Journal* № 1 (1)/2016, 85-88.

338. Popovski A., Popovska A. Experience in application of Nimotop S, as a therapy for arterial hypertension in intracranial haemorrhage. *J. Neurol. Sci.* 1997. Vol. 150, suppl. 1. P. S222–S223.

339. Preventive effect of Piracetam and Vinpocetine on hypoxia-reoxygenation induced injury in primary hippocampal culture / P. Solanki et al. *Food Chem. Toxicol.* 2011. Vol. 49, issue 4. P. 917–922.

340. Roger L. Lundblad, Fiona Macdonald. / *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition* / - CRC Press, 2010. - 1098 p.

341. Saify Z. S., Sultana N. Role of Acetylcholinesterase Inhibitors and Alzheimer Disease. *Drug Design Discov. Alzheimer's Dis.* 2014. P. 387–425.

342. Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia / S. L. Mehta, S. Kumari, N. Mendeleev, P. A. Li. *BMC Neurosci.* 2012. Vol. 12 (3). P. 45–50.

343. Sokolik E. P. Nitrozone stress and neurological disorders in experimental alcohol intoxication and their pharmacological correction by neuropeptides. *X Int. Congress of Medical Sciences : abstracts, 12-15 may, 2011, Sofia, Bulgaria.* Sofia, 2011. P. 23.

344. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study, preceded by an in utero exposure phase and genotoxicity studies with fish source phosphatidylserine in rats / Y. Lifshitz et al. *Food Chem. Toxicol.* 2015. Vol. 86. P. 234–244.

345. Substituted piperazines as nootropic agents: 2- or 3-phenyl derivatives structurally related to the cognition-enhancer DM235 / L. Guandalini et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015. Vol. 25, issue 8. P. 1700–1704.

346. Teplyakov A. I., Kruchinsky N. G., Andryanova D. V. Hemostasiological and rheological aspects of combined parenteral nimotop and rheomacrodex application in ischemic stroke. *Atherosclerosis.* 1997. Vol. 134, issues 1-2. P. 95.

347. The effects of piracetam on heroin-induced CPP and neuronal apoptosis in rats / P. Xu et al. *Drug Alcohol Depend.* 2015. Vol. 150. P. 141–146.

348. The role of glutamatergic, GABA-ergic, and cholinergic receptors in depression and antidepressant-like effect / K. Pytka et al. *Pharmacol. Rep.* 2016. Vol. 68, issue 2. P. 443–450.

349. The role of neuropeptide Y in the pathophysiology of atherosclerotic cardiovascular disease / P. Zhu et al. *Int. J. Cardiol.* 2016. Vol. 220. P. 235–241.

350. Time-dependent impact of glutamatergic modulators on the promnesiant effect of 5-HT₆R blockade on mice recognition memory / R. Asselot et al. *Pharmacol. Res.* 2017. Vol. 118. P. 111–118.

351. Torres S. Y., Verdecia Y., Rebolledo F. Chemoenzymatic approach to optically active 1,4-dihydropyridine derivatives. *Tetrahedron*. 2015. Vol. 71, issue 23. P. 3976–3984.

352. Tursunhodjaeva G., Abdumavljanova N. Application of noofenin complex treatment of children with patrimonial traumas of CNS. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2007. Vol. 11, suppl. 1. P. 110.

353. Valenzuela C. F. Alcohol and Neurotransmitter Interactions. *Alcohol Health Res. World*. 2007. Vol. 21, N 2. P. 144–150.

354. Warner T. D. Relationships between the endothelin and nitric oxide pathways. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2009. Vol. 26, N 3. P. 247–252.

ДОДАТКИ

Додаток А

**А К Т В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я**

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакокорекція наслідків нейротоксичних поразень при тяжких формах гострих отруень етанолом.
- 2. Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26. Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І., Абрамов А. В., Павлюк І. В.
- 3. Джерело інформації (назва, рік видання, вихідні дані):** Павлюк І.В. Фармакокорекція последствий нейротоксических поражений при тяжелых формах острых отравлений этанолом / Павлюк И.В., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Абрамов А.В. // «Світ медицини та біології» № 4 (58) 2016 С.93-98.
- 4. Ким впроваджено:** ДП «Державний науковий центр лікарських засобів та медичної продукції» (ДП «ДНЦЛЗ»)
- 5.Ефективність впровадження:** методика використана при формуванні інформаційного забезпечення наукового процесу в науково-дослідних лабораторіях фармако-токсикологічного профілю ДП «ДНЦЛЗ».
- 6. Пропозиції та зауваження:** не вносилися.
 Обговорено та затверджено на засіданні ДП «Державного наукового центру лікарських засобів і медичної продукції», протокол № 1 від " 5 " лютого 2018 р.

Відповідальний за впровадження:

Голова комісії: - проф., докт.біол.н. Маслова Н.Ф.;

Члени комісії: - проф. докт.фарм.н. Казарінов М.О.;

- ст.н.сотр. Котляр В.О.

Маслова
Котляр
Казарінов

Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»,
чл.-кор. НАМН України, професор
Черпева Т.О.



2018 р.

А К Т В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я
матеріалів дисертаційної роботи Павлюка Івана Володимировича
у науково-педагогічний процес

1. Найменування пропозиції для впровадження: «Вплив ангиоліну на морфо-функціональні показники СА-1 зони гіпокампу та процеси нейроапоптозу при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації при лікувальному режимі введення».

2. Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів: Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26. Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І., Абрамов А. В., Павлюк І. В.

3. Джерело інформації (назва, рік видання, вихідні дані): Павлюк І.В. Влияние Ангиолина на морфо-функциональные показатели СА-1 зоны гипокампа и процессы нейроапоптоза при моделировании хронической алкогольной интоксикации при лечебном режиме введения / Павлюк И.В., Беленичев И.Ф., Абрамов А.В. Кучеренко Л.И. // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал. – 2016. – Вип. 1, Т. 1(126). - С.130-136.

4. Ким впроваджено: кафедра фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровської медичної академії МОЗ України».

5. Термін впровадження: січень-травень 2018 р.

6. Ефективність впровадження: методика, подана до впровадження, використана при формуванні інформаційного забезпечення науково-педагогічного процесу кафедри.

7. Пропозиції та зауваження: немає

Протокол засідання кафедри № 7, від 1 лютого 2018 р.

Завідувач кафедри фармакології і клінічної фармакології
ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
д.мед.н., доцент

В. І. Жилюк

Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної роботи
 Одеського національного медичного
 університету, з.д.н.т. України, д.мед.н.,
 проф. _____ Ю. І. Бажора
 «_____» _____ 2017 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів наукових досліджень

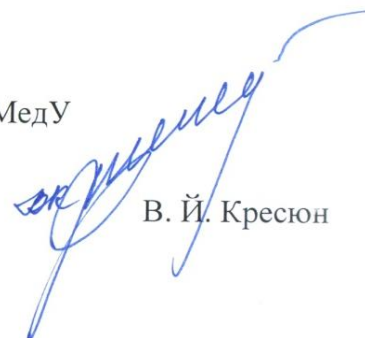
Беленічева І. Ф., Кучеренко Л. І., Павлюк І. В. в учбовий процес

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакологічна корекція порушень та у пов'язаних системах NO-вільні тіоли при хронічній алкогольної інтоксикації за допомогою нейропротектору "Ангіолін"
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26. Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І., Павлюк І. В.
3. **Джерело інформації :** Pavlyuk I. V. Antioxidant Modulation of NO-Dependent Mechanisms of Oxidative Stress Initiation in Brain of Rats Subjected to Chronic/ I.F. Belenichev, I. V. Pavlyuk, L. I. Kucherenko // Biological Markers and Guided Therapy.- 2016.- Vol. 3, №. 1.- P. 177 – 184.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі загальної та клінічної фармакології Одеського національного медичного університету в лекційному курсі та при проведенні практичних занять за розділом «Ноотропи. Аналептики. Речовини, що викликають зловживання» з січня 2017 р.
5. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Беленічева І. Ф., Кучеренко Л. І., Павлюк І. В. в учбовому процесі дозволяє розширити знання студентів про нові розробки в області нейропротективних засобів.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри,
 протокол № 6 від 17.01. 2017

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри загальної та клінічної фармакології ОНМедУ
 чл.-кор. НАМН України,
 д.мед.н., проф.


 В. Й. Кресюн

Продовження додатку А



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
 Запорізького державного
 медичного університету
 д. мед. н., професор
 Туманський В. О.

« ____ » _____ 2017 р.

А К Т В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакокорекція Ангіоліном порушень енергетичного метаболізму в головному мозку крис в наслідок хронічної алкогольної інтоксикації.
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26. Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І., Павлюк І. В.
3. **Джерело інформації (назва, рік видання, вихідні дані):** Павлюк І.В. Фармакокорекция Ангиолином нарушений энергетического метаболизма в головном мозге крыс вследствие хронической алкогольной интоксикации / Павлюк И.В., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И. // «Світ медицини та біології» № 1 (59) 2017 С. 90-94.
4. **Ким впроваджено:** кафедра фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету
5. **Термін впровадження:** січень-травень 2017р.
6. **Ефективність впровадження:** методика, подана до впровадження, використана при формуванні інформаційного забезпечення науково-педагогічного процесу кафедри.
7. **Пропозиції та зауваження:** немає

Завідувач кафедри фармакології
 та медичної рецептури д.б.н., професор

І. Ф. Беленічев

Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи ВДНЗ України«Буковинський державний
медичний університет»,доцент  І. В. Геруш

2018 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Порівняльна оцінка нейропротективної дії похідних L-лізину в умовах гострої алкогольної інтоксикації.
2. **Установа-розробник, адреса, ПІБ авторів:** Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26. Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І., Павлюк І. В.
3. **Джерело інформації (назва, рік видання, вихідні дані):** Павлюк І.В. Сравнительная оценка нейропротективного действия производных L-лизина в условиях острой алкогольной интоксикации / Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Павлюк И.В. // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал Випуск 4, том 1(133), С. 117-122.
4. **Ким впроваджено:** кафедра фармакології, ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет».
5. **Термін впровадження:** січень-травень 2017р.
6. **Ефективність впровадження:** методика, яка подана до впровадження, використана при формуванні інформаційного забезпечення науково-педагогічного процесу кафедри.
7. **Пропозиції та зауваження:** немає.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фармакології,
доктор медичних наук, професор



І. І. Заморський

Додаток Б

Україна



Державне підприємство «Завод хімічних реактивів»

Науково-технологічного комплексу «Інститут монокристалів» Національної академії наук України
пр. Леніна, 25, м. Харків, Україна, 61166, тел. (38) 057-341-05-01, 341-05-47, факс. (38) 057-719-46-07

СЕРТИФІКАТ ЯКОСТІ № 1

АНГІОЛІН® (субстанція)

Аналіз виконаний відповідно до проекту МКЯ

Серія 010413 Кількість 20 кг Кількість 10 місцьДата виготовлення 04 2013 р. Вид упаковки: пакети поліетиленові

ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ

№ з/п	Найменування показників	Вимоги проекту	Результати випробувань
1	Опис	Кристалічний порошок білого або майже білого кольору із слабким специфічним запахом	<input type="checkbox"/> кристалічний порошок білого кольору із слабким спец. запахом; <input checked="" type="checkbox"/> кристалічний порошок майже білого кольору із слабким специфічним запахом
2	Розчинність	Випробування	<i>випробується</i>
3	Ідентифікація: ІЧ-спектр 3-Метил-1,2,4-триазоліл-5-тіооцтова кислота Сірка	Відповідність ІЧ-спектру ФСЗДФУ Випробування Випробування	<i>випробується</i>
4	Температура плавлення, °С	Від 210 до 215 (з розкладанням)	<i>214</i>
5	Прозорість розчину	Має бути прозорим	<i>соответствует</i>
6	Кольоровість розчину	Не інтенсивніший за еталон Y ₇	<i>соответствует</i>
7	pH (2,5 % розчин)	Від 6,0 до 8,0	<i>6,5</i>
8	Питоме оптичне обертання, °	Від +9,5 до +12,5 (у перерахунку на суху речовину)	<i>+11,8</i>
9	Супровідні домішки, % - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіон - будь-яка інша додаткова домішка - сума усіх додаткових домішок	Не більше 0,5 Не більше 0,1 Не більше 0,5	<i><0,5</i> <i><0,1</i> <i><0,5</i>
10	Важкі метали, %	Не більше 0,001 (10 ppm)	<i><0,001</i>
11	Втрата в масі при висушуванні, %	Не більше 0,5	<i>0,1</i>
12	Сульфатна зола, %	Не більше 0,1	<i>0,03</i>
13	Мікробіологічна чистота, КУО/г	Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) - не більше 10 ³	<i>60</i>
		Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) - не більше 10 ²	<i>20</i>
14	Кількісне визначення, %	Не менше 98,5 і не більше 101,0 (у перерахунку на суху речовину)	<i>99,6</i>

Зберігати при температурі не вище 25 °С.

Термін придатності 2 роки Придатний до 04 2015 р. (з урахуванням дати виробництва «найстарішої» серії/операції в суміші)

Висновок: субстанція відповідає вимогам проекту МКЯ

Начальник ВТК *[підпис]* Шаповалова Л.І. 29 07 2013 р.

Цим я засвідчую, що наведена вище інформація є достовірною та точною. Цю серію продукції було вироблено (включаючи пакування /маркування) та проведено контроль її якості у повній відповідності з вимогами GMP відповідно до специфікації, що містяться у реєстраційному додє. Протоколи виробництва, пакування та аналізу було переглянуто та встановлено відповідність GMP.

Випуск дозволено:

Уповноважена особа *[підпис]* Гринашук О.І.Дата підписання 31 07 2013 р.Дата відвантаження 08 08 2013 р.Кількість 20 кг 10 місць 1Уповноважена особа *[підпис]*

Україна, м. Харків
ДП «Завод хімічних реактивів»
НТК ІМК НАН України

УПОВНОВАЖЕНА ОСОБА



Додаток В

Список публікацій здобувача

1. Павлюк И. В. Влияние Ангиолина на морфо-функциональные показатели СА-1 зоны гиппокампа и процессы нейроапоптоза при моделировании хронической алкогольной интоксикации при лечебном режиме введения / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов, Л. И. Кучеренко // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал – 2016. – вип.1, Т.1(126). – С.130-136. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

2. Pavlyuk I. V. Antioxidant Modulation of NO-Dependent Mechanisms of Oxidative Stress Initiation in Brain of Rats Subjected to Chronic Alcohol Intoxication / I. V. Pavlyuk, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko // Biological Markers Guided Therapy. – NIKARI Ltd. – 2016. – Vol. 3, №1. – P. 177-184. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

3. Павлюк И. В. Сравнительная оценка нейропротективного действия производных L-лизина в условиях острой алкогольной интоксикации / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал. – 2016. – Вип.4, Т 1(133). – С. 117-122. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

4. Pavlyuk I. V. Pharmacological effects on oxidative stress NO-dependent mechanisms in the brain under chronic alcohol intoxication: Angiotensin antioxidant effects/ I. V. Pavlyuk, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko // //American Scientific Journal. – 2016. – № 1(11). – P. 85-88 *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

5. Павлюк И. В. Фармакокоррекция последствий нейротоксических поражений при тяжелых формах острых отравлений этанолом / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, А. В. Абрамов // «Світ медицини та біології». – 2016. – №4 (58). – С. 93-98. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

6. Павлюк И. В. Фармакокоррекция Ангиолином нарушений энергетического метаболизма в головном мозге крыс вследствие хронической алкогольной интоксикации / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко // «Світ медицини та біології». – 2017 – № 1 (59). – С. 90-94. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

7. Пат. 106867 Україна, МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01). Спосіб корекції неврологічних порушень при хронічній алкогольній інтоксикації. / І. В. Павлюк, І. Ф. Беленічев, О. О. Нагорна, Л. І. Кучеренко, М. О. Авраменко, І. А. Мазур; заявник ТОВ НВО «Фарматрон». – № а 2014 07033; заявл. 23.06.2014; опубл. 10.10.2014. Бюл. № 19. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних).*

8. Пат. 111462 Україна, МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01). Застосування (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату як активної основи лікарських засобів для профілактики та лікування порушень життєзабезпечуючих функцій ЦНС при важких формах гострого отруєння етанолом. / І. В. Павлюк, Л. І. Кучеренко, І. Ф. Беленічев, І. А. Мазур, О. С. Бідненко; заявник ТОВ НВО «Фарматрон». – № 2016 00367; заявл. 16.01.2016; опубл. 25.04.2016. Бюл. № 8. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних).*

9. Павлюк И. В. Создание метаболитотропных эндотелиопротекторов - фокус на «Ангиолин» / И. В. Павлюк, Н. В. Парнюк, О. И. Беленичева //

Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств», Москва, 3-5 июня 2013 г. – Москва, 2013. – С. 13.

10. Павлюк И. В. Молекулярные аспекты нейропротективного действия нового препарата «Ангиолин» при формировании хронической алкогольной интоксикации у крыс. / И. В. Павлюк // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2013 р. – Запоріжжя, 2013. – С. 30.

11. Павлюк И. В. Red/Ox – зависимые механизмы нейроапоптоза при депривации системного уровня восстановленного глутатиона *in vitro* HSP70 – опосредованные нейропротективные свойства тиольного антиоксиданта «Ангиолин» / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур, Н. В. Парнюк, Н. В. Бухтиярова, Е. В. Однокоз // Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты. Международная конференция молодых ученых и I-V школа им. академика Н.М. Эмануэля 1-4 октября Москва 2013. – С. 272.

12. Павлюк И. В. Влияние Тиоцетама на показатели нитрозирующего стресса в головном мозге животных с хронической алкогольной интоксикацией / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур, Т. В. Кучер // Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» Сборник материалов конгресса. Москва 7-11 апреля 2014 г. Москва, 2014. – С. 206.

13. Павлюк И. В. Влияние Ангиолина на показатели митохондриальной дисфункции головного мозга у крыс после формирования хронической алкогольной интоксикации. / И. В. Павлюк // Тези доповідей «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» 12-13 травня 2016 р. – Запоріжжя, 2016. – С. 41.

14. Павлюк И. В. Профилактический и лечебный нейропротективные эффекты таблеток Ангиолин при курсовом введении животным с хронической алкогольной интоксикацией. / И. В. Павлюк, И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Т. Ю. Винниченко // V Національний з'їзд фармакологів України. 18-20 жовтня 2017 р. – Запоріжжя, 2017. – С. 84.

Додаток Г
Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи виконані та обговорені на:

1. Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва 3-5 червня 2013 р., форма участі – публікація тез);
2. Международная конференция молодых ученых и I-V школа им. академика Н.М. Эмануэля «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» (Москва 1-4 жовтня 2013 р., форма участі – публікація тез);
3. Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва 7-11 квітня 2013 р., форма участі – публікація тез);
4. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації - 2016» (12-13 травня 2016 р., м. Запоріжжя – усна доповідь);
5. V Національний з'їзд фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя – публікація тез).