

*На правах рукописи*



**Шукуров Аслиддин Сайфиддинович**

**Антиконвульсивное действие замещенных соединений**

**2- аминоэтансульфоновой кислоты в эксперименте**

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Блинова Екатерина Валериевна**

**Официальные оппоненты:**

**Покровский Михаил Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, заведующий кафедрой

**Яснецов Виктор Владимирович** – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, лаборатория экспериментальной и клинической фармакологии, заведующий лабораторией; отдел космической радиобиологии и фармакологии, заместитель заведующего отдела

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «28» июня 2022 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.11 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 2022 г

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Дроздов Владимир Николаевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Эпилепсия – это хроническое заболевание головного мозга, характеризующееся формированием рецидивирующего судорожного синдрома и других нарушений функций центральной нервной системы (ЦНС) [R.S. Fisher et al., 2014]. По данным международных популяционных исследований около 1% населения мира нуждается в приеме противоэпилептических лекарственных средств, и этот показатель характеризуется высокой стабильностью и неизменностью в течение многих десятилетий [W.A. Hauser, E. Beghi., 2008].

Клинические исследования показывают, что у 30-40% пациентов лечение впервые диагностированной эпилепсии с помощью «старых» (первой генерации) противоэпилептических лекарственных средств (карбамазепин, производные вальпроевой кислоты – вальпроаты) оказывается либо неэффективным либо требует отмены вследствие развития серьезных нежелательных реакций [R.H. Mattson, et al., 1985]. У 30% лиц регистрируется сохранение судорожной активности на фоне приема специфических лекарственных препаратов в виде моно- или комбинированной терапии, такое отсутствие полного фармакологического контроля описывается как фармакорезистентная эпилепсия [P. Kwan, M.J. Brodie, 2004]. Все указанное выше обуславливает непрекращающийся поиск новых молекул, а также мишеней для лекарственного содействия, с целью обеспечения оптимального соотношения активность – безопасность в лечении заболевания [J.A. French et al., 2013].

Последние три десятилетия ознаменовались выходом на рынок более 20 новых (второго и третьего поколений) противоэпилептических лекарственных средств с уникальным механизмом действия и особенностями системной фармакокинетики [E. Perucca et al., 2020], что позволило существенно расширить опциональность терапии и вооружило клиницистов новыми лечебными возможностями. В то же время, отчета Американской академии неврологии (AAN) за 2004 и 2018 годы указывали на то, что новые препараты не улучшили эффективность контроля над судорожным синдромом, но обладали лучшей переносимостью и более благоприятным профилем безопасности, в том числе связанным со снижением частоты нейротоксических осложнений [J.A. French et al. A.M., 2004, Kanner et al., 2018].

В 2017 году Международной лигой по борьбе с эпилепсией (ILAE) была опубликована новая классификация заболевания с уточнением типов судорог и синдромов [R.S. Fisher, J.H. Cross et al., 2017, T. Halimi, 2021]. Это было сделано как для улучшения понимания патогенеза и клинического течения болезни, так и роли отдельных лекарственных препаратов в терапевтических стратегиях.

Все вышеперечисленное обуславливает чрезвычайную актуальность проведения комплексных фармакологических исследований, посвященных дизайну, синтезу и изучению

противосудорожной и антиэпилептогенной активности новых перспективных молекул – потенциальных кандидатов в лекарственные средства.

### **Степень разработанности темы исследования**

Фармакологическими предпосылками проведения настоящего исследования являются ранее полученные в лабораториях ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева» обнадеживающие научные данные об особенностях и спектре терапевтических эффектов нового класса веществ – металлосодержащих и замещенных производных 2-аминоэтансульфоновой кислоты [Semeleva E.V., Vlinova E.V. et al., 2020].

В частности, было установлено, что в ряду металлосодержащих и замещенных производных 2-аминоэтансульфоновой кислоты цинковая и магниевая соли с циклической и разветвленной структурой проявляют свойства нейропротекторов на экспериментальных моделях глобальной мозговой гипоксии у мышей, необратимого и транзиторного ишемического нарушения мозгового кровообращения у крыс [Громова И.А., 2021]. В работах Ю.С. Крайновой и Е.В. Семелевой было установлено, что в основе реализации эффекта лежат противоотечные, антирадикальные свойства молекул, ранее спрогнозированные с использованием метода количественного анализа структура – активность [Семелева Е.В, 2021, Крайнова Ю.С., 2020].

В исследовании И.А. Громовой было показано, что указанные вещества при курсовом парентеральном введении способны устранять вызванные ишемическим повреждением головного мозга явления неврологического дефицита и оптимизировать функциональную активность глутаматных некаинатных NMDA-рецепторов, тем самым снижая явления глутамат-индуцированной эксайтотоксичности.

Коллективом исследователей был также предложен рациональный метод получения активных и стабильных субстанций представителей класса, пригодных для проведения фармакологических исследований [Гераськина М.М., 2019].

### **Цель исследования**

Изучить противосудорожную и антиэпилептогенную активность двух металлосодержащих соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты и обосновать некоторые механизмы фармакологического действия наиболее активного вещества.

### **Задачи исследования**

1. Провести внеэкспериментальный программный количественный анализ структура – активность в ряду металлосодержащих соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты с циклической и разветвленной структурой для определения мишеней потенциального противосудорожного и антиэпилептогенного действия.

2. На скрининговой модели ENU-индуцированного эпилептогенеза у G3 генерации мутантных мышей СЗН/Je определить наиболее эффективное вещество в ряду металлосодержащих соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты.

3. Изучить противосудорожное действие цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты у лабораторных крыс с пилокарпиновой моделью эпилепсии при внутрижелудочном курсовом введении в дозах, составляющих 1,25 и 2,5% от показателя ЛД<sub>50</sub>.

4. Изучить влияние внутрижелудочного курсового введения цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛХТ-318 на уровень тревожности и поведенческие реакции крыс на различных этапах формирования и развития пилокарпинового эпилептогенеза.

5. Определить особенности реализации механизма антиэпилептогенного действия соединения ЛХТ-318 при курсовом внутрижелудочном введении крысам с экспериментальной пилокарпиновой эпилепсией: изучить концентрацию провоспалительных цитокинов и морфологическую структуру областей головного мозга, вовлеченных в развитие патологического процесса.

6. Изучить влияние инкубации культуры кортикальных нейронов G3 генерации мутантных мышей СЗН/Je с ENU-индуцированным эпилептогенезом в присутствии ЛХТ-318 на выживаемость нейронов и спонтанный кальциевый электрогенез в зависимости от экспрессии кальций-связывающего белка парвальбумина.

### **Научная новизна**

В рамках комплексного экспериментального фармакологического исследования цинкового и магниевого соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты впервые установлено противосудорожное и антиэпилептогенное действие соединений данного химического класса.

При проведении внеэкспериментального количественного анализа структура – активность с применением специальной программной среды было впервые установлено, что с вероятностью более 60% у магниевой (ЛХТ-317) и цинковой (ЛХТ-318) солей 2-аминоэтансульфоновой кислоты прогнозируется широкий спектр биологической активности, который, исходя из целей и задач настоящего исследования, включает ноотропную, радиопротекторную, цитопротекторную активность, противосудорожную активность, антагонизм с каинатными глутаматными NMDA-рецепторами, а также ингибиторную активность в отношении ряда ферментов, участвующих в формировании нейрональной синаптической эксайтотоксичности и нейровоспаления.

На скрининговой модели аудиогенных судорог, развивающихся у потомства третьего поколения мутантных мышей СЗН, установлены фармакологические преимущества цинкового соединения ЛХТ-318 при курсовом внутрижелудочном введении в дозе, составляющей 5% от показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного для мышей, перед магниевым соединением в виде снижения

частоты развития аудиогенных судорог, повышения латентного периода их возникновения, и сопоставимого с препаратом сравнения карбамазепином сокращения тяжести и продолжительности судорожного пароксизма.

Впервые показано, что на модели острых пилокарпиновых судорог циклическая цинковая соль 2-аминосульфоновой кислоты при курсовом внутрижелудочном введении в дозе, пропорциональной 2,5% от показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного для крыс, снижает тяжесть и продолжительность судорожного эпизода. На экспериментальной модели эпилептогенеза установлено двенадцатикратное при сравнении с контролем сокращение спонтанной судорожной активности, регистрируемой с 5 по 8 недели эпилептогенеза, лабораторных крыс, получавших ЛХТ-318.

Впервые установлено, что курсовое внутрижелудочное введение соединения ЛХТ-318 в терапевтических дозах не влияет на уровень тревожности крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом, однако повышает двигательную и познавательную активность животных, измеренную в тесте «Открытое поле».

С использованием количественного иммуноферментного анализа впервые показано, что на фоне курсового внутрижелудочного введения ЛХТ-318 в гиппокампе лабораторных крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом снижается тканевая концентрация провоспалительных цитокинов – ФНО-альфа и ИЛ-1бета. Морфологическими методами установлено сохранение популяции нейронов гиппокампа, ограничение разрастания мшистых волокон в зубчатой борозде головного мозга крыс, что в совокупности доказывает наличие нейропротекторного и противовоспалительного действия ЛХТ-318 при данном виде экспериментальной патологии.

Установлено, что добавление 1 мМ соединения ЛХТ-318 в свежую культуру кортикальных нейронов мутантных мышей третьего поколения СЗН не только повышает выживаемость клеток в безмагниевой среде, но и создает оптимальные условия культивирования и повышает экспрессию кальций-связывающего белка парвальбумина тормозными ГАМКергическими нейронами. В экспериментах с применением внутриклеточного флюоресцентного зонда Fura-2 и методов биоимиджинга впервые показано, что ЛХТ-318 ограничивает спонтанный кальциевый электрогенез, что объясняет механизм противосудорожной активности соединения.

### **Научно-практическая значимость работы**

Установленные в настоящей диссертационной работе закономерности реализации противосудорожной и антиэпилептогенной активности цинкового соединения 2-аминоэтановой кислоты вносят существенный вклад в общие фармакологические знания о спектре и механизме действия металлосодержащих и замещенных соединений сульфокетокислот.

Использование программного внеэкспериментального количественного анализа структура – активность при построении дизайна и последующей реализации фармакологических работ позволяет планировать *in vivo* этап исследования с большей направленностью, целенаправленно отбирать потенциальные мишени для экспериментальной проверки и подтверждения вида и силы эффекта.

Полученные результаты о спектре и механизме антиэпилептогенного действия цинкового циклического соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты (вещества ЛХТ-318) могут быть использованы при проведении углубленного доклинического исследования кандидата в лекарственные средства, при разработке оптимальной лекарственной формы, определении путей и режимов введения, а также выполнении фармакокинетических исследований.

### **Методология и методы исследования**

При формировании дизайна настоящей работы, ее планировании и методической проработке базировались на основополагающих принципах единства цели и задач, комплексности и междисциплинарности. В целом, работа построена по этапному принципу и включала три главных раздела: внеэкспериментального прогнозирования и скрининга, *in vivo* изучения фармакологического спектра и механизмов действия и исследований в культуре клеток.

Внеэкспериментальный количественный анализ структура – активность в ряду металлосодержащих соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты провели с использованием программной среды PASSonline, способной на основе сопоставления химической структуры вещества с имеющимися в базе данных сведениями о видах биологической активности прогнозировать вероятность активирующего или подавляющего взаимодействия лиганда с потенциальной мишенью. Скрининг противосудорожной активности проведен на модели аудиогенных судорог у G3 генерации мышей с ENU-индуцированным эпилептогенезом.

Для изучения особенностей реализации противосудорожного и антиэпилептогенного действия была выбрана модель пилокарпиновых судорог у крыс, позволяющая, с одной стороны изучить противосудорожный потенциал в остром опыте, а, с другой – воспроизводить отсроченную спонтанную судорожную активность, в основе которой лежит морфологическое повреждение областей гиппокампа и зубчатой борозды головного мозга. В качестве маркеров нейровоспаления использовали тканевую концентрацию ФНО-альфа и ИЛ-1бета, определенную количественным иммуноферментным анализом типа «сэндвич». Влияние ЛХТ-318 на процессы эпилептогенной нейродегенерации изучили с использованием двух методом окрашивания областей поражения головного мозга крыс – крезил-виолетом по Нисслию и нео-Timm,

позволяющих количественно оценить жизнеспособность популяции нейронов и формирование патологических изменений в зубчатой борозде.

Для проведения клеточных исследований была выбрана свежая культура кортикальных нейронов мутантных мышей со спонтанной судорожной активностью. Выживаемость нейронов под действием ЛХТ-318 оценивали с использованием метода цитохимии. Влияние соединения на экспрессию парвальбумина ГАМергическими нейронами, а также особенности кальциевого электрогенеза установлено методами иммунофлюоресценции и внутриклеточного биоимиджинга.

### **Связь работы с научными программами, планами, темами**

Диссертационная работа выполнена при частичной финансовой поддержке темы «Доклинические исследования лекарственного средства, действующего на NMDA-рецептор (ионотропный глутаматный рецептор) – глутаматный сайт, ионный канал, для лечения острых нарушений мозгового кровообращения», проводимой в рамках госконтракта №14.N08.11.0183 от 22.11.2017 года на выполнение прикладных научных исследований и экспериментальных разработок, шифр 2017-14-N08-0088 Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Основные научные положения диссертационного исследования внедрены и используются в учебной работе кафедры фармакологии и фармацевтической технологии Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), кафедры пропедевтики внутренних болезней и клинической фармакологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), отдела химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ». Исследование поддержано грантом Президента Российской Федерации НШ-843.2022.3 2022-2023 гг.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Скрининговые исследования противосудорожной активности цинкового и магниевого соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты на модели аудиогенных судорог у мутантных мышей С3Н подтвердили результаты внеэкспериментального количественного прогноза структура – активность, при этом наибольшим эффектом на представленной модели обладает цинковая соль ЛХТ-318, сопоставимая по силе подавления судорожных эпизодов с препаратом сравнения карбамазепином.

2. Внутривентрикулярное курсовое введение цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛХТ-318 в дозах, составляющих 2,5 и 1,25% от показателя ЛД<sub>50</sub> крысам с пилокарпиновым эпилептогенезом предотвращает как частоту и тяжесть острого судорожного эпизода, так и частоту спонтанной отсроченной судорожной активности, снижает выраженность нейродегенеративных изменений в гипоталамусе и зубчатой борозде головного мозга животных, а также активность нейровоспалительной реакции.

3. Цинксодержащее соединение 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛХТ-318 в концентрации 1 мМ повышает выживаемость кортикальных нейронов свежей культуры мутантных мышей СЗН, индуцирует экспрессию кальций-связывающего белка парвальбумина в популяции ГАМКергических нейронов и подавляет спонтанную обусловленную кальциевым электрогенезом судорожную активность нейронов в безмагниевого среде.

### **Степень достоверности**

Достоверность полученных в настоящем диссертационном исследовании положений и выводов подтверждается логично построенным дизайном исследования, отвечающим современным представлениям об алгоритме отбора и изучения противоэпилептических и противосудорожных лекарственных средств; корректным использованием для прогнозирования потенциального взаимодействия лиганд – мишень количественного фармакологического анализа структура – активность; выбором в качестве объектов моделирования экспериментальной патологии третьей генерации потомства мутантных мышей СЗН и лабораторных крыс с воспроизведением описанных в международной научной периодике наиболее приближенных к условиям реальной клинической практики моделей аудиогенных и пилокарпин-индуцированных судорог соответственно; использованием валидированных и международно-апробированных методов изучения поведенческих реакций в тестах «крестообразный лабиринт» и «открытое поле», тканевой концентрации цитокинов – с помощью экспертных наборов антител и количественного ИФА типа «сэндвич», морфологических изменений ЦНС – окрашивания по Нисслю и нео-Timm; применением инновационных внутриклеточных методов регистрации концентрации ионизированного кальция, а также цитохимических и иммунофлюоресцентных методов регистрации выживаемости и типа нейронов; использованием общепринятых методов формирования экспериментальных групп, регистрации и записи результатов исследования, их анализа с помощью методов вариационной и описательной статистики.

### **Апробация диссертационной работы**

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им.

Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №6 от 04.04.2022 г.

Результаты представленного диссертационного исследования докладывались и обсуждались на 19<sup>th</sup> International Federation of Associations of Anatomists Congress (London, United Kingdom, 2019), XXVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2021), XXIII Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2021).

#### **Личный вклад автора**

Диссертант самостоятельно сформулировал гипотезу и основную научную идею представленной диссертационной работы, построил ее дизайн, спланировал исследование, разработал методический подход к достижению цели и реализации основных задач диссертационного проекта. Лично автором проведен программный внеэкспериментальный количественный фармакологический анализ структура – активность, выполнены исследования на лабораторных животных, поставлены тесты для оценки поведенческих реакций и интерпретированы их результаты. Диссертант самостоятельно выполнял иммуноферментный анализ, включенно участвовал в проведении морфологического раздела исследования. При непосредственном участии автора проведены все эксперименты в культуре кортикальных нейронов. Автор лично обобщил полученные результаты, проанализировал их. Диссертант принимал непосредственное и самое деятельное участие в подготовке научных публикаций, освещающих основные результаты проведенных им исследований. Автор самостоятельно подготовил настоящую рукопись.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология, областям исследований «Поиск новых биологически активных фармакологических веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях патологических состояний» и «Исследование зависимости «структура–активность» в различных классах химических веществ, проведение направленного синтеза и скрининга фармакологических веществ».

#### **Публикации**

По теме диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы, из них 4 полнотекстовых статьи изданы в научных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, в том числе 1 – в журнале, индексируемом международной системой цитирования Scopus.

## Объём и структура диссертации

Диссертация написана по традиционному плану, включает следующие разделы: введение, главу 1 – литературный обзор, главу 2 с описанием материалов и методов исследования. В главе 3 изложены результаты внеэкспериментального прогноза и лабораторного скрининга, в главе 4 – результаты исследований на лабораторных крысах, в главе 5 – на культурах клеток. Глава 6 (заключение) обобщает полученные научные результаты.

Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста, иллюстрирована двадцатью одним рисунком и семью таблицами. Библиографический список содержит выходные данные 139 работ, из которых 9 работ отечественных и 130 зарубежных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Исследование выполнено в полном соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»).

Объектом исследования были выбраны два соединения 2-аминоэтановой кислоты, синтезированные в лаборатории химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО ВНЦ БАВ (Россия): магния бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-317) цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318) (рисунок 1).

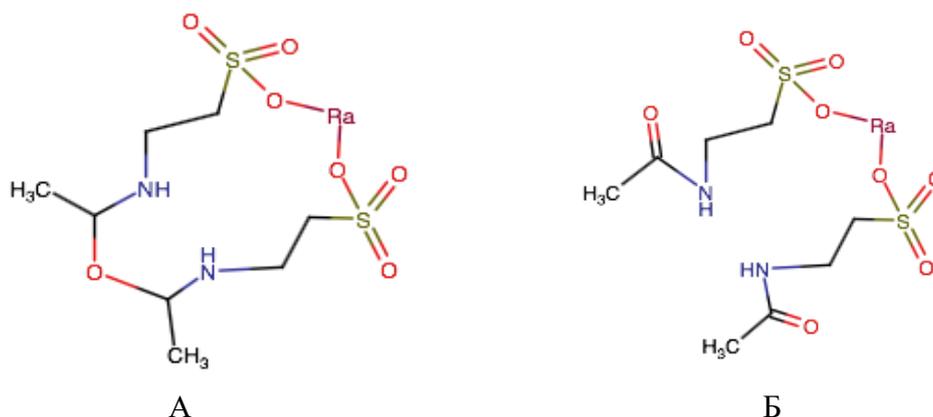


Рисунок 1 – Структурные формулы изученных веществ: А – цинковая соль (ЛХТ-3-18), Б – магниевая соль (ЛХТ-317)

Дизайн исследования включал три последовательных этапа. На первом этапе оба соединения были изучены на модели генетически-детерминированной эпилепсии у мышей в скрининговом режиме при курсовом внутривнутрибрюшинном введении магниевой и цинковой солей

2-аминоэтансульфоновой кислоты в дозах, составляющих 2,5% от показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного для мышей. По результатам выполнения этапа было отобрано одно вещество с наибольшей противосудорожной активностью для продолжения проведения экспериментальных исследований.

На втором этапе наиболее активное соединение было изучено на модели пилокарпиновой эпилепсии у лабораторных крыс в хроническом эксперименте. На этой же модели были изучены некоторые механизмы действия цинк-содержащего соединения сульфокетокислоты ЛХТ-318.

Третий этап включал изучение цинкового соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты в смешанной нейроглиальной культуре коры головного мозга новорожденных мышей СЗН при моделировании повышенной возбудимости нейронов и клеток астроцитарной глиии – основных клеточных популяций, задействованных в эпилептогенезе.

В качестве референсного противосудорожного препарата (препарата сравнения) на всех выбранных моделях эпилептогенеза использовали производное дибензазепина карбамазепин в виде субстанции в силу того, что препарат с доказанной противоэпилептической активностью, подавляет глутаматергическую эксайтотоксичность, позитивно влияет на когнитивную и эмоциональную сферу в эксперименте и клинике.

При выборе доз исследуемых соединений и референтного препарата с противосудорожным эффектом руководствовались имеющимися результатами проведения токсикологических исследований (для соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты – по данным Громовой И.А., 2019, Крайновой Ю.С., 2020 и Семелевой Е.В., 2021), а также данными об оптимальных клинических дозах карбамазепина с учетом правил межвидового биологического переноса доз (Гуськова Т.А., 2005).

Для достижения цели и задач настоящего исследования, связанных с необходимостью курсового профилактического введения исследуемых веществ и препаратов сравнения, ЛХТ-317, ЛХТ-318, а также референтное противосудорожное средство карбамазепин вводили внутрь в крахмальном 2% клейстере в объеме 1 мл у крыс и 0,5 мл у мышей.

В *in vivo* разделе работы применяли грызунов трех видов: лабораторных крыс обоего пола линии Wistar весом 180-250 г., приобретенных в питомнике «Электрогорский» ФГБУН Национальный центр биомедицинских технологий ФМБА России, потомство линейных мышей СЗН/HeJ весом 18-22 г., полученных в питомнике «Столбовая» ФГБУН Национальный центр биомедицинских технологий ФМБА России, скрещенных с мышами C57Bl6 весом 18-22 г., полученных в питомнике SPF-животных ФГБУН Научно-исследовательский институт биоорганической химии им. академиков Шемякина и Овчинникова РАН (г. Пущино Московской области). Потомство скрещенных мышей было предоставлено Институтом

нейронаук ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (г. Нижний Новгород). Эксперименты в рамках настоящей диссертационной работы не сопровождались болезненными процедурами и манипуляциями, в связи с чем обезболивание животных не применялось. Выведение лабораторных грызунов из эксперимента проводили под эфирным наркозом.

Формирование экспериментальных групп осуществляли исходя из требований статистической репрезентативности и необходимости получения достоверных результатов основываясь на принципах гуманного обращения с животными и минимизации количества животных в группе. В каждую экспериментальную группу включали не более 6 особей мышей или крыс.

Для неэкспериментального количественного анализа структура-активность применяли специальную программу PASSonline. Модель аутосомно-рецессивного эпилептогенеза воспроизводили по методу, описанному Е.В. Борисовой и соавт. (2017). Для стимуляции судорожного синдрома применяли аудиогенную стимуляцию животных. Тяжесть конвульсивной реакции оценивали по шкале Крушинского. В качестве базовой модели эпилептогенеза использовали пилокарпиновую экспериментальную модель. Оценивали реакцию животных на введение пилокарпина гидрохлорида, после чего в течение последующих 4 недель животные переводились на обычный режим содержания. Начиная с 5-й недели проводили видеорегистрацию двигательной активности крыс по 5 дней в неделю в течение 12 часов (с 7 до 19 часов). Регистрировали количество судорожных эпизодов, их продолжительность и тяжесть. Для последующего статистического анализа учитывали только пароксизмы интенсивностью от 2 до 4 баллов. Частота спонтанной судорожной активности рассчитывалась как совокупность всех судорожных пароксизмов за все время наблюдения на одно животное (около 360 часов на животное). Введение исследуемого вещества (внутрижелудочно) и препарата сравнения осуществляли в течение 7 суток до формирования экспериментальной модели эпилептогенеза, а также на протяжении первых 4 недель после введения пилокарпина гидрохлорида. Соединения ЛХТ-318 вводили в двух дозах, пропорциональных 2,5 и 1,25% от показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного при данном пути введения у крыс. Оценку поведенческих реакций животных проводили в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт.

Для оценки эпилептогенных изменений в головном мозгу животных проводили морфологическое исследование срезов органа выведенных из эксперимента животных, окрашенных кризил-виолетом по Нисслию и методом нео-Timm. Тканевую концентрацию ФНО-альфа и ИЛ-1 бета в ткани головного мозга определяли количественным ИФА типа «сэндвич» с использованием коммерческих наборов «CUSABIO BIOTECH Inc.» (Китай).

Клеточную культуру головного мозга новорожденных мышей потомства G3 1-3 дней с эпилептогенным мутагенезом готовили в соответствии с описанием Gaidin et al. (2020). Концентрацию цитоплазматического ионизированного кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) оценивали с использованием двухволнового внутриклеточного зонда Fura-2 в соответствии с ранее описанным методом Gaidin et al. (2020) и Turovskaya et al. (2020). Выживаемость клеток и экспрессия кальций-связывающих белков оценивалась иммуноцитохимическим методом.

Результаты экспериментов представляли в виде средних значений и среднеквадратических отклонений ( $M \pm MSE$ ), либо, в случае непараметрических данных – в виде абсолютных значений. Для проверки гипотезы нормального распределения признаков в совокупностях применяли одномерный дисперсионный анализ или критерий Колмогорова-Смирнова. Для определения значимости различий между группами в случае параметрической презентации значений пользовались критериями Тьюки (при сравнении трех и более совокупностей). При сопоставлении непараметрических признаков использовали точный критерий Фишера. Применяли пакет статистических программ BioStat (Россия) и SPSS (США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием программы PASS провели количественный анализ структура – активность магниевых и цинковых соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты. Было установлено, что с вероятностью, превышающей 60% у исследуемых соединений прогнозируется широкий спектр биологической активности, который, исходя из целей и задач настоящего исследования, включает ноотропную, радиопротекторную, цитопротекторную активность, противосудорожную активность, антагонизм с каинатными глутаматными NMDA-рецепторами, а также ингибиторную активность в отношении ряда ферментов, участвующих в формировании нейрональной синаптической эксайтотоксичности и нейровоспалительной реакции. По данным количественного прогноза соединения цинка может применяться для лечения болезни Альцгеймера и в качестве ингибитора мембранной проницаемости. У обоих соединений прогнозируется активность по подавлению образования активных форм кислорода, что также косвенно подтверждается спектром вовлеченных в этот процесс ферментативных систем, в отношении которых оба соединения проявляют антагонистические свойства. В целом, по результатам проведенного количественного анализа у соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты установлена высокая потенциальная способность оказывать терапевтические свойства при экспериментальном эпилептогенезе, что убедительно обосновывало целесообразность проведения дальнейшего фармакологического поиска.

При проведении фармакологического скрининга на модели ENU-индуцированного эпилептогенеза у мышей СЗН исследуемые вещества обладали разной силой эффекта (таблица

1). Цинк-содержащее соединение 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛХТ-318 воспроизводило эффекты референтного противосудорожного препарата карбамазепина: не регистрировали гибели животных, получавших соединений в суточной дозе 110 мг/кг, конвульсивные пароксизмы в виде клонических и – в одном случае – тонических пароксизмов наблюдали у 4 животных в группе. В то же время на фоне недельного внутрибрюшинного введения магниевого соединения ЛХТ-317 частота формирования судорожного синдрома увеличивалась до 83,3%. В целом, судороги носили более тяжелый характер, что привело к гибели 1 мыши в данной экспериментальной группе (таблица 1). В результате, на основании проведения скринингового этапа исследования, в качестве соединения, обладающего наибольшим фармакологическим потенциалом для изучения в качестве потенциального противосудорожного средства, было выбрано вещество цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоат (ЛХТ-318).

Таблица 1 – Влияние внутрижелудочного введения карбамазепина и ЛХТ-318 на продолжительность судорожного синдрома и латентный период у крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом (n=6 в каждой группе животных)

Исследуемое соединение	Доза, мг/кг в сутки	Время		
		до ПМВ, с	до начала судорог, с	длительности судорог, мин
Контроль	-	22±4	41±5	90±1
Карбамазепин	2,5	35±5	58±3*	62±11*
ЛХТ-318	22,5	41±3*	62±5*	66±7*
	11,3	36±7	59±4*	71±9*

Примечания: ПМВ – психомоторное возбуждение; \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем (одномерный дисперсионный анализ, критерий Тьюки)

На пилокарпиновой модели эпилептогенеза изучили противосудорожную и антиэпилептогенную активность цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоата. Оценили влияние курсового внутрижелудочного введения соединения на частоту формирования и тяжесть эпилептического статуса у крыс с острыми пилокарпиновыми судорогами, провели исследование отсроченной спонтанной судорожной активности животных на фоне продолжения экспериментальной терапии ЛХТ-318 в двух дозах в сравнении с референсным противэпилептическим средством карбамазепином. В аспекте изучения некоторых механизмов формирования терапевтического эффекта определили концентрацию провоспалительных цитокинов в области интереса головного мозга, а также изучили наличие

морфологических эквивалентов эпилептического поражения ЦНС в гипоталамусе и зубчатой борозде.

Было установлено, что на модели пилокарпинового эпилептогенеза циклическая цинковая соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты проявляет свойства антиконвульсанта: снижает тяжесть острого судорожного пароксизма, предотвращает формирование спонтанной судорожной активности, и по силе антиконвульсивного действия сопоставимо с препаратом сравнения карбамазепином (рисунок 2).

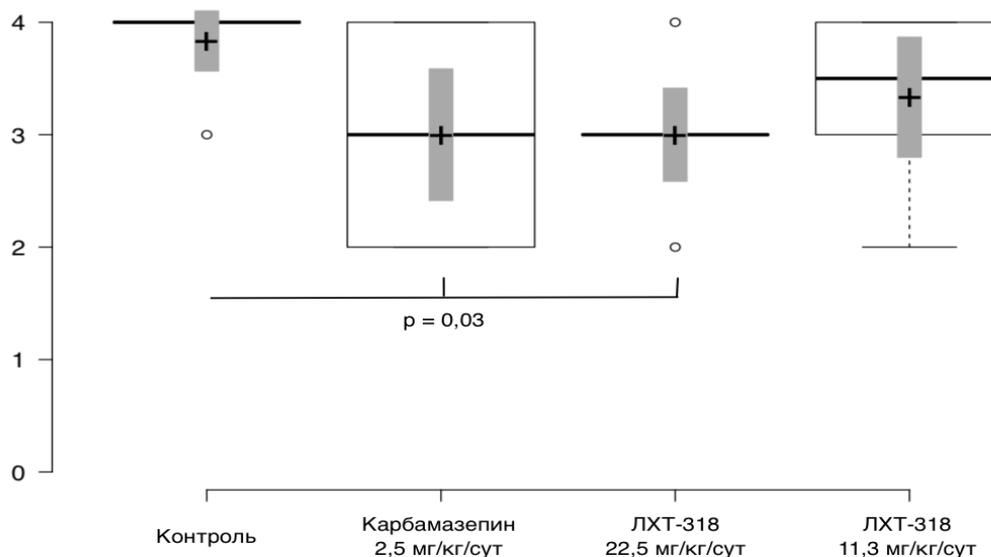


Рисунок 2 – Тяжесть судорожного синдрома у животных с острыми пилокарпиновыми судорогами (n=6 в каждой группе животных): одномерный дисперсионный анализ, критерий Тьюки. Данные представлены в виде  $M \pm MSE$

Начиная с 29-ых по 56-е сутки после формирования модели пилокарпиновой эпилепсии проводили видеорегистрацию спонтанной двигательной активности бодрствующих животных 5 дней в неделю с 7.00 до 19.00 при помощи цифровых видеокамер, записывающих активность лабораторных крыс с нанесенными на их хвосты и холки цветными метками (рисунок 3). В контрольной группе в пересчете на 1 крысу в среднем регистрировали 33,6 спонтанных эпизодов судорожной активности в течение 4 недель наблюдения. Конвульсивные пароксизмы были кратковременными продолжительностью от нескольких секунд до 1,5 мин, купировались самостоятельно. В течение наблюдения гибели животных не наблюдали. Препарат сравнения карбамазепин при курсовом 4-недельном введении в дозе 2,5 мг/кг в сутки внутривентрикулярно снижал частоту спонтанной судорожной активности более, чем в 5 раз до в среднем 6,7 эпизодов за 4 недели. Исследуемое соединение при введении в дозе 22,5 мг/кг превосходило препарат сравнения по влиянию на спонтанные судороги: частота эпизодов не превышала в среднем 3,8 на 1 крысу в мес. Снижение вводимой дозы вдвое приводило к некоторому

ослаблению профилактического действия цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты, при этом, в целом, выраженный противосудорожный эффект сохранялся.

Также в рамках данного раздела работы изучили влияние цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата на поведенческие реакции грызунов с экспериментальным пилокарпиновым эпилептогенезом. Для этого в тесте приподнятый крестообразный лабиринт фиксировали время, проведенное в открытом и закрытом рукавах лабораторной установки, и количество входов в упомянутые рукава.

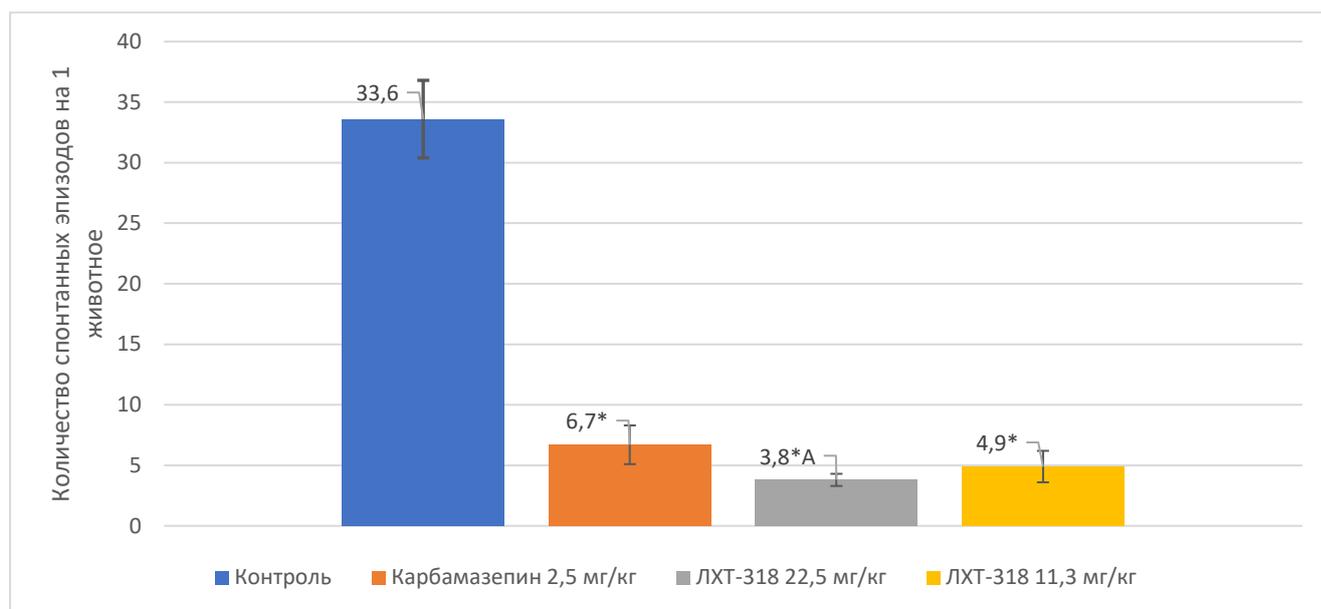


Рисунок 3 – Влияние экспериментальной курсовой терапии ЛХТ-318 на спонтанную судорожную активность крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом; данные представлены в виде  $M \pm MSE$ ; \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем; A  $p < 0,05$  при сравнении с карбамазепином (критерии Колмогорова-Смиронова и Тьюки)

В отличие от препарата сравнения, исследуемое соединение ЛХТ-318 не проявляло противотревожных свойств в представленном тесте. В обеих дозах курсовое введение цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты не приводило к снижению общей тревожности животных в подгруппах, но, при этом, не наблюдали и усугубления фобического радикала в поведении животных (таблица 2).

В тесте «открытое поле» оценили влияние ЛХТ-318 на двигательную и познавательную активность лабораторных животных. Также как и на модели приподнятого крестообразного лабиринта, мы еще раз подтвердили низкий противотревожный потенциал ЛХТ-318: и в исходно более тревожной подгруппе и у нетревожных крыс после формирования экспериментальной эпилепсии заметно увеличивалось время, затрачиваемое на груминг, однако, в отличие от контроля, на фоне терапии он носил заверченный и правильный характер. Отличительной чертой влияния соединения цинка 2-аминоэтансульфоноата на профиль поведенческих реакций является протекция когнитивной и двигательной функции, особенно

ярко проявлявшаяся на фоне назначения соединения в дозе 22,5 мг/кг в сутки первично тревожным животным: сохранялось стабильное число заглядываний в норки, стоек, а также число пересечения секторов лабиринта.

Таблица 2 – Влияние ЛХТ-318 на уровень тревожности животных с пилокарпиновым эпилептогенезом (ПЭ) в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (n = 6 в каждой группе)

Исследуемое вещество	Доза, мг/кг/сут	Показатель	Тревожные животные		Нетревожные животные	
			До ПЭ	На 56 сутки	До ПЭ	На 56 сутки
Контроль	-	ЧНО,%	12,4±2,3	14,6±3,1	32,6±4,2	11,6±1,4*
		ЧЗО,%	33,5±4,2	8,7±1,4*	43,2±3,8	21,5±3,1*
Карбамазепин	2,5	ЧНО,%	13,6±1,7	20,4±2,1* <sup>А</sup>	26,1±3,2	24,3±3,3 <sup>А</sup>
		ЧЗО,%	27,8±2,9	31,4±6,4 <sup>А</sup>	40,5±4,1	51,2±7,6 <sup>А</sup>
ЛХТ-318	22,5	ЧНО,%	14,2±3,4	13,2±1,8	29,5±3,7	15,4±2,9*
		ЧЗО,%	31,6±5,3	10,8±2,5*	51,6±6,4	19,4±4,2*
	11,3	ЧНО,%	12,4±2,3	14,6±3,1	30,7±2,6	13,8±2,9*
		ЧЗО,%	33,5±4,2	8,7±1,4*	42,4±4,3	22,7±11,5

Примечания: ЧНО – доля времени, проведенного в открытых рукавах лабиринта к общему времени нахождения в лабиринте, ЧЗО – доля заходов в открытые рукава лабиринта об общего числа входов; \*  $p < 0,05$  при сравнении с показателем до введения пилокарпина (парный t-тест); <sup>А</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с контролем (ANOVA, критерий Тьюки)

Таким образом, в структуре противоэпилептогенного действия цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты помимо противосудорожного действия также установлены позитивные эффекты в отношении познавательной и двигательной активности, при том, что соединение не способно корректировать расстройства тревожного радикала.

Для оценки активности воспалительной реакции в ответ на формирование пилокарпин-индуцированного эпилептогенеза определили концентрацию провоспалительных цитокинов ФНО-альфа и ИЛ-1бета, у которых, по данным литературы доказана роль в формировании и поддержании нейровоспалительной реакции. Соединение ЛХТ-318 изучено в максимальной вводимой дозе – 22,5 мг/кг в сутки (рисунок 4). При этом в ткани животных, получавших в течение 4 недель соединение цинка 2-аминоэтансульфоновой кислоты в указанной дозе, наблюдали снижение тканевой концентрации ФНО-альфа до 32,4 пг/мл в среднем ( $p = 0,001$  при сравнении с контрольными значениями), при этом данный показатель не достигал значения такового у интактных животных ( $p = 0,01$  при сравнении со значениями интактных животных);

также регистрировали снижение тканевой концентрации ИЛ-1бета до 27,8 пг/мл в среднем ( $p = 0,001$  при сравнении с контрольными значениями), при этом данный показатель также не достигал значения такого у интактных животных ( $p = 0,05$  при сравнении со значениями интактных животных).

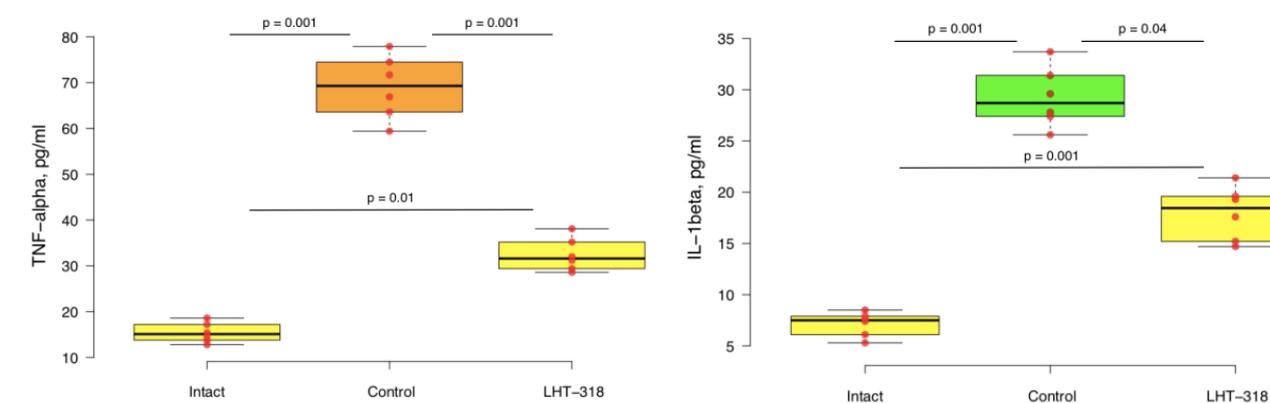


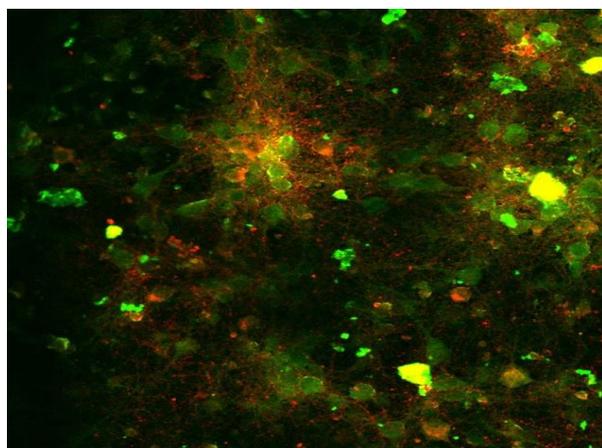
Рисунок 4 – Влияние ЛХТ-318 в дозе 22,5 мг/кг/сут на тканевую концентрацию ФНО-альфа и ИЛ-1бета; ANOVA, критерий Тьюки

Следовательно, цинковая соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты способна сдерживать развитие воспалительной реакции в ткани головного мозга, формирующейся вследствие его фармакологического повреждения пилокарпином у лабораторных крыс. Этот эффект может играть одну из ключевых ролей в антиэпилептогенном действии изучаемого соединения.

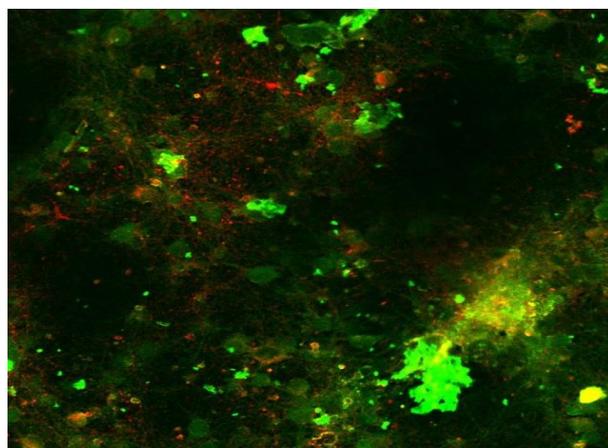
С использованием морфологических методов исследования – применения окрашивания срезов ткани головного мозга подопытных крыс по Ниссля и способом нео-Timm, в группе экспериментальной терапии нам удалось показать, что лечение лабораторных животных цинковой солью 2-аминоэтансульфоновой кислоты в дозе 22,5 мг/кг в сутки в течение 4 недель – с 5 по 8 недели включительно, позволяет предотвращать критическую гибель нейронов, при этом их плотность в пересчете на 1 мм<sup>2</sup> составляет в среднем 443 нейронов ( $p = 0,04$  при сравнении с контрольными значениями). Также предотвращается критическое разрастание мшистых волокон клеток гранул зубчатой борозды головного мозга экспериментальных крыс. Следует также сказать, что экспериментальная терапия не приводила к полной профилактике клеточной гибели в зонах интереса ( $p = 0,001$  при сравнении со значениями интактных животных).

На свежей кортикальной культуре трехсуточных мышей генерации G3 с ENU-индуцированным эпилептогенезом формировали дополнительные условия повышенной возбудимости и судорожной активности нейронов путем инкубации клеток в безмагниевой среде после регистрации исходных параметров выживаемости нейронов, окрашивая их пропидия иодидом. Мы установили, что вещество ЛХТ-318 обладает нейропротекторными

свойствами в отношении нейронов коры большого мозга эпилептогенных мышей ввиду того, что во всех экспериментах гибель нейронов не превышала 5% (диапазон колебаний гибели 4-5% в трех культурах. При этом следует подчеркнуть, что на фоне лекарственного воздействия наблюдали снижение фоновой гибели, что говорит о том, что ЛХТ-318 в концентрации 1мМ оптимизирует условия инкубации культуры (рисунок 5).



А. Флюоресцентное свечение



Б. ЛХТ-318 1 мМ

Рисунок 5 – Экспрессия парвальбумина ГАМКергическими нейронами культуры кортикальных нейронов на фоне ЛХТ-318

В патогенезе эпилептогенной повышенной возбудимости кортикальных клеток одну из ключевых ролей играет популяция ГАМКергических нейронов, поскольку гамма-аминомасляная кислота является естественным тормозным медиатором в ЦНС, а ГАМК-бензодиазепиновый рецепторный комплекс представляет собой ведущую мишень для разработки эффективных противосудорожных лекарственных средств. При этом, функциональное состояние ГАМКергических нейронов в том числе определяется уровнем экспрессии одного из кальций-связывающих белков – парвальбумина. Для определения влияния ЛХТ-318 на плотность парвальбумин-экспрессирующих ГАМКергических нейронов в культуре кортикальных нейронов окрашивали последние анти-GAD65/67 (на определение ГАМК) и анти-PV (парвальбумин) антителами с использованием флюоресцентной метки.

Экспериментальное фармакологическое воздействие повышает экспрессию парвальбумина популяцией ГАМКергических нейронов в среднем на 56% по сравнению с фоновыми значениями на контрольных культурах клеток. Полученные результаты позволяют заключить, что ЛХТ-318 в концентрации 1 мМ активирует тормозные внутриклеточные процессы в ГАМКергических нейронах, связанных с накоплением и активацией связывающих кальций макромолекул.

С помощью внутриклеточных зондов Fura 2 регистрировали кальциевые ответы кортикальных нейронов интактной культуры и культуры клеток мышей с ENU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом в магниевой и безмагниевой среде (рисунок 6). Инкубация исследуемого соединения в культуре кортикальных нейронов мышей дикого типа полностью подавляла спонтанную возбудимость, которая, после отмывки медленно восстанавливалась до исходного уровня, причем, кальциевый электрогенез не экспрессирующих парвальбумин нейронов превышал исходные уровни.

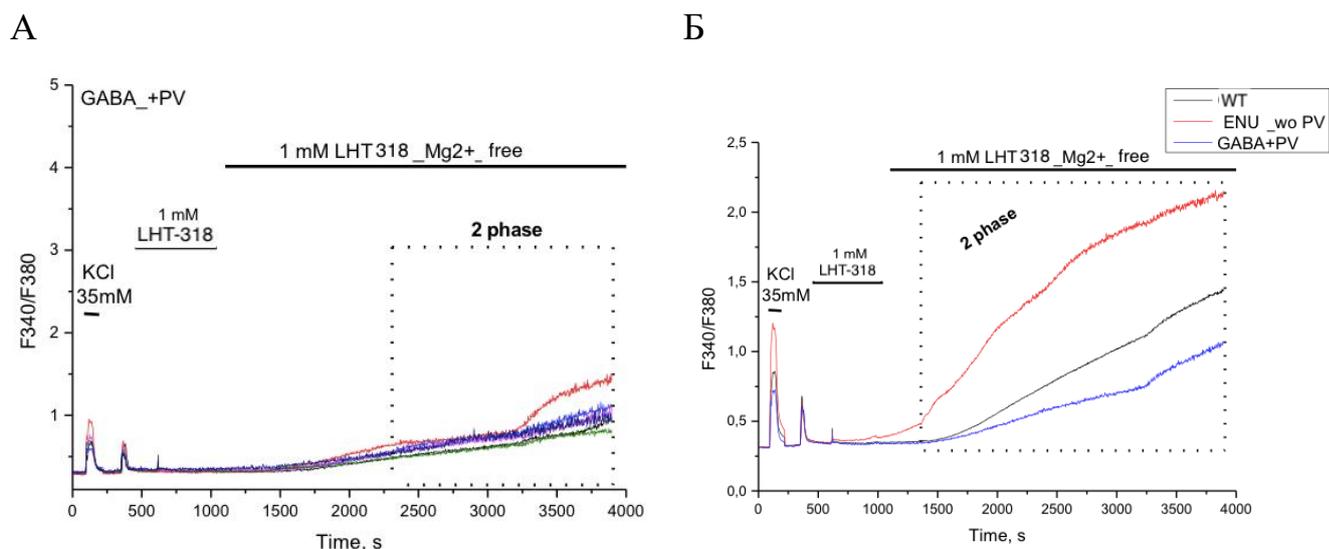


Рисунок 6 – Интенсивность спонтанных кальциевых ответов культуры кортикальных нейронов мышей C57B16 без мутагенного эпилептогенеза (WT) и мышей СЗН с ENU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом (ENU) в насыщенной магнием (А) и в безмагниевой (Б) среде на фоне инкубации с 1 мМ ЛХТ-318

В культуре кортикальных нейронов мутантных мышей изменения носили более контрастный характер: соединение ЛХТ-318 в исследуемой концентрации также подавляло спонтанную активность, при этом, после отмывки нейронов наибольшая скорость восстановления кальциевого электрогенеза с наибольшей амплитудой регистрировалась в случае с нейронами, не экспрессирующими парвальбумин, тогда как кальциевый электрогенез ГАМКергических парвальбумин-содержащих нейронов восстанавливался с наименьшей скоростью

Следовательно, на основании проведенного исследования, мы можем заключить, что цинковая циклическая соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты обладает способностью не только повышать жизнеспособность нейронов, активировать экспрессию кальций-связывающего белка, но и сдерживать спонтанную активность нейронов, лежащую в основе формирования судорожной активности.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **Итоги выполненного диссертационного исследования**

Таким образом, в результате выполнения работы было показано, что циклическое цинковое соединение 2-аминоэтансульфоновой кислоты является перспективным веществом для последующей разработки на его основе лекарственного средства с антиконвульсантными свойствами. Было установлено, что спектр фармакологической активности, включающий подавление генерации аудиогенных судорог у животных с ENU-индуцированным эпилептогенезом, и пилокарпинового судорожного синдрома, снижения активности воспалительной реакции в ткани ГМ, предотвращения морфологической перестройки отделов ЦНС, участвующих в эпилептогенной трансформации, соответствует внеэкспериментальному прогнозу структура – активность. Использование молекулярных методов исследования позволило доказать, что цинковая циклическая соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты обладает способностью не только повышать жизнеспособность нейронов, активировать экспрессию кальций-связывающего белка, но и сдерживать спонтанную активность нейронов, лежащую в основе формирования судорожной активности.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Полученные в работе научные результаты открывают широкую перспективу для продолжения исследований металлосодержащих соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты циклической и разветвленной структуры. Установленное противосудорожное и антиэпилептогенное действие цинковой соли ЛХТ-318 требует дальнейшего углубленного изучения, в частности, с использованием микроэлектродной техники – с применением имплантируемых электродов в головной мозг экспериментальных животных – для определения субклинической пароксизмальной спонтанной активности и фармакологического влияния на нее. Важное значение имеет расширение спектра моделей экспериментальной эпилепсии для изучения особенностей реализации фармакологического действия ЛХТ-318, а также установления и уточнения закономерностей поведенческих паттернов в этих условиях.

С точки зрения прикладной фармакологии несомненные перспективы представляет проведение комплекса исследований в предрегистрационном объеме: по разработке фармацевтической субстанции и лекарственной формы кандидата в лекарственное средство, фармакокинетики действующего вещества при внутривенном и пероральном путях введения, а также изучение безопасности ЛХТ-318.

## **ВЫВОДЫ**

1. Количественный программный анализ структура – активность цинкового и магниевого соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты показал высокую прогнозную вероятность ( $P_a >$

0,75) формирования нейропротекторного и противоэпилептогенного ( $P_a > 0,6$ ) действия, сочетающегося с антирадикальной и противовоспалительной активностью.

2. На экспериментальной модели эпилепсии у мутантных мышей СЗН/HeJ в отличие от магниевого соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты, цинковое соединение ЛХТ-318 при курсовом внутрижелудочном введении в дозе, составляющей 5% от показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного для мышей, на 33,3% снижает частоту развития аудиогенных судорог ( $p = 0,03$  при сравнении с контролем), на 27% повышает латентный период их возникновения ( $p = 0,04$  при сравнении с контролем) и сокращает тяжесть и продолжительность судорожного пароксизма.

3. Цинковая циклическая соль 2-аминосульфоновой кислоты при курсовом внутрижелудочном введении в дозе, пропорциональной 2,5% от показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного для крыс, снижает тяжесть и продолжительность острого пилокарпинового судорожного эпизода; в 12 раз при сравнении с контролем сокращает спонтанную судорожную активность крыс, регистрируемую с 5 по 8 недели эпилептогенеза.

4. Курсовое введение соединения ЛХТ-318 в терапевтических дозах не влияет на уровень тревожности животных с пилокарпиновым эпилептогенезом, при этом предотвращает формирование двигательного дефицита и познавательной активности экспериментальных крыс.

5. В головном мозге крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом установлено снижение на 53% при сравнении с контролем тканевого содержания ФНО-альфа и на 7% – ИЛ-1бета, сохранение популяции нейронов гиппокампа, ограничение разрастания мшистых волокон в зубчатой борозде, что в совокупности доказывает наличие нейропротекторного и противовоспалительного действия ЛХТ-318 при данном виде экспериментальной патологии.

6. Инкубация свежей культуры кортикальных нейронов мутантных мышей G3 СЗН с 1 мМ соединения ЛХТ-318 в безмагниевого среде повышает на 50-60% выживаемость клеток, индуцирует экспрессию парвальбумина тормозными ГАМКергическими нейронами, и ограничивает спонтанный кальциевый электрогенез, что объясняет механизм противосудорожной активности соединения.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Полученные результаты о противосудорожной и антиэпилептогенной активности цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты могут быть использованы при планировании и проведении углубленных доклинических исследований кандидата в лекарственные средства на предрегистрационном этапе исследований.

2. Предложенный и обоснованный в работе алгоритм скринингового исследования противосудорожной и антиэпилептогенной активности новой молекулы с предполагаемым

эффектом может быть использован профильными лабораториями и кафедрами, занимающимися фармакологией психотропных и нейропротекторных лекарственных средств.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Церебропротекторная активность цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛХТ-3-18 в условиях острого кислородного дефицита *in vivo* и *in vitro* / Крайнова Ю.С., Блинова Е.В., Семелева Е.В., Блинов Д.С., Юрочкина А.М., Туровский Е.А., Лобанова Е.Г., Дагар Е.А., Орлов Е.А., **Шукуров А.С.** / **Вестник Смоленской государственной медицинской академии**. 2019. Т.18. №3. С. 10-17. [ВАК]
2. Metal-containing taurine compounds protect rat's brain in reperfusion-induced injury / Semeleva E.V., Blinova E.V., Zaborovsky A.V., Vasilkina O.V., **Shukurov A.S.** / **Research Results in Pharmacology**. 2020. Т. 6. № 4. С. 1-8. [ВАК, Scopus]
3. Протекторное действие некоторых солей 2-аминоэтансульфоновой кислоты на экспериментальной модели дегенеративного повреждения спинного мозга / Семелева Е.В., Блинова Е.В., Заборовский А.В., Василькина О.В., **Шукуров А.С.** / **Вестник «Биомедицина и Социология»**. 2020. Т.5. №3. С.41-47 [ВАК]
4. **Шукуров А.С.**, Блинова Е.В., Шукуров Ал.С., Залогин С.Д., Семелева Е.В. Противосудорожное действие некоторых металлосодержащих соединений сульфокислоты / **Вестник «Биомедицина и Социология»**. 2022. Т.7. №1. С.39-46 [ВАК]

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ГМ – головной мозг

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛД – летальная доза

ЛС – лекарственное средство

ФНО – фактор некроза опухолей

ЦНС – центральная нервная система