

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Шукуров Аслиддин Сайфиддинович

**Антиконвульсивное действие замещенных соединений
2- аминоэтансульфоновой кислоты в эксперименте**

14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Блинова Екатерина Валериевна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ И ИЗУЧЕНИЮ НОВЫХ АНТИКОНВУЛЬСАНТОВ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	17
1.1 Современные взгляды на механизмы эпилептогенеза.....	17
1.2 Влияние антиконвульсантов на процесс эпилептогенеза.....	19
1.3 Антиэпилептогенный потенциал лекарственных препаратов, не проявляющих противосудорожных свойств.....	24
1.4 Успехи комбинированной терапии судорожных расстройств.....	30
1.5 Противосудорожные эффекты веществ с антиоксидантными свойствами.....	31
1.6 Новые соединения с противосудорожной активностью.....	33
1.7 Новые перспективные мишени для создания современных антиконвульсантов	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1 Дизайн диссертационного исследования	43
2.2 Соблюдение принципов биоэтики и гуманного обращения с животными при выполнении исследования.....	44
2.3 Общие сведения об исследуемых в работе соединениях 2-аминоэтансульфоновой кислоты и препаратах сравнения.....	46
2.4 Лабораторные животные и условия их содержания. Принципы формирования экспериментальных групп.....	48
2.5 Модель мутагенного эпилептогенеза	50
2.6 Модель пилокарпинового эпилептогенеза.....	54
2.7 Методы оценки поведенческих реакций крыс на модели экспериментального пилокарпинового эпилептогенеза.....	56
2.7.1 Метод изучения уровня тревожности в тесте приподнятый крестообразный лабиринт.....	56

2.7.2 Метод изучения поведенческих реакций животных с пилокарпиновым эпилептогенезом в тесте открытое поле	58
2.8 Методы морфологического и молекулярного исследования	59
2.8.1 Морфологические методы исследования.....	59
2.8.2 Метод определения тканевой концентрации ИЛ-1бета и ФНО-альфа в ткани головного мозга крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом	60
2.9 Методы исследования ЛХТ-318 в смешанной кортикальной культуре мышей с мутагенным эпилептогенезом	61
2.10 Методы статистического анализа результатов	65
ГЛАВА 3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ	
СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ	
2-АМИНОЭТАНСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЫ СКРИНИНГ	
ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ.	
67	
3.1 Количественный анализ структура – активность магниевого и цинкового соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты	67
3.2 Скрининг противосудорожной активности ЛХТ-317 и ЛХТ-318 на модели мутагенного эпилептогенеза у мышей с аудиогенными судорогами.....	80
ГЛАВА 4. ПРОТИВОСУДОРОЖНОЕ И АНТИЭПИЛЕПТОГЕННОЕ	
ДЕЙСТВИЕ ЦИНКОВОЙ СОЛИ 2-АМИНОЭТАНСУЛЬФОНОВОЙ	
КИСЛОТЫ НА ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ	
85	
4.1 Противосудорожное действие ЛХТ-318 на пилокарпиновой модели эпилептогенеза.....	85
4.2 Влияние ЛХТ-318 на поведенческие реакции животных с пилокарпиновым эпилептогенезом.....	89
4.3 Влияние цинкового соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты на активность эпилептогенной нейровоспалительной реакции	95
4.4 Влияние цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты на морфологию зон головного мозга, вовлеченных в эпилептогенез на пилокарпиновой экспериментальной модели.....	97
4.4.1 Плотность нейронов гиппокампа под действием ЛХТ-318	97

4.4.2 Влияние курсового введения ЛХТ-318 крысам с пилокарпиновым эпилептогенезом на интенсивность разрастания мшистых волокон зубчатой борозды головного мозга.....	99
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ЦИНК-СОДЕРЖАЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ 2-АМИНОЭТАНСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ НЕЙРОНОВ И НЕКОТОРЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЫШЕННОЙ ВОЗБУДИМОСТИ	102
5.1 Выживаемость кортикальных нейронов в условиях эпилептогенеза под действием ЛХТ-318.....	102
5.2 Влияние цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты на экспрессию парвальбумина	105
5.3 Характеристика кальциевого ответа кортикальных нейронов на воздействие ЛХТ-318	107
ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
6.1 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования.....	121
ВЫВОДЫ	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Эпилепсия – это хроническое заболевание головного мозга, характеризующееся формированием рецидивирующего судорожного синдрома и других нарушений функций центральной нервной системы (ЦНС) [1]. 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 [2].

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 [3]. 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 [4]. Все указанное выше обуславливает непрекращающийся поиск новых молекул, а также мишеней для лекарственного воздействия, с целью обеспечения оптимального соотношения активность – безопасность в лечении заболевания [5, 6].

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 [7], 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 [8-11].

В 2017 году Международной лигой по борьбе с эпилепсией (ILAE) была опубликована новая классификация заболевания с уточнением типов судорог и синдромов [12-15]. 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 [16].

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 [17]. 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 [18, 19].

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 некаионатных NMDA-рецепторов, тем самым снижая явления глутамат-индуцированной эксайтотоксичности [17].

Коллективом исследователей был также предложен рациональный метод получения активных и стабильных субстанций представителей класса, пригодных для проведения фармакологических исследований [20].

Цель работы

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 ЛД₅₀.

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 ЛД₅₀, 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 ЛД₅₀, 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 методов окрашивания областей поражения головного мозга крыс – крезил-виолетом по Нисслю 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 эксперссию парвальбумина ГАМергическими нейронами, а также особенности кальциевого электрогенеза установлено методами иммунофлюоресценции и внутриклеточного биоимиджинга.

Связь диссертации с основными научными 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 имени 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».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Скрининговые исследования противосудорожной активности цинкового и магниевого соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты на модели аудиогенных судорог у мутантных мышей СЗН 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 ЛД₅₀ 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 противосудорожных 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 Нислю 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 04.04.2021 г.

Результаты представленного диссертационного исследования докладывались и обсуждались на 19th 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).

Внедрение результатов диссертационного исследования

Основные научные положения, выводы и рекомендации внедрены в учебный процесс кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского при изучении дисциплины «клиническая фармакология», читаемой студентам по направлению подготовки 31.05.01 «Лечебное дело», Акт № 29 от 29.03.22, а также в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования при изучении дисциплин «фармакология» и «клиническая фармакология», читаемой студентам и слушателям по направлениям подготовки 31.05.01 «Лечебное дело» и 33.05.01 «Фармация» Акт № 30 от 29.03.22.

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, области 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», «Исследование зависимости «структура–активность» в различных классах химических веществ, проведение направленного синтеза и скрининга фармакологических веществ».

Публикации по теме диссертационной работы

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 работы

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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ И ИЗУЧЕНИЮ НОВЫХ АНТИКОНВУЛЬСАНТОВ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Противоэпилептические лекарственные средства (иначе называемые в фармакологии антиконвульсантами) способны эффективно контролировать течение патологического процесса у не более 65-70% пациентов, страдающих судорожным синдромом. Эти ограничения эффективности в полной мере относятся и к препаратам 2 и 3 поколений, что обуславливает высокую актуальность поиска новых к подходов к патогенетической терапии эпилепсии и к разработке новых перспективных лекарственных средств [21]. Помимо этого, широкое обсуждение в научном сообществе в настоящее время сконцентрировано на проблеме эпилептогенной трансформации центральной нервной системы (ЦНС) на фоне приема антиконвульсантов, что также придает мощный стимул научно-практическому поиску в этой предметной области [22].

Как известно, эпилептогенез – это устойчивый процесс, в результате которого происходит конверсия нормального головного мозга (ГМ) человека в так называемый «эпилептический ГМ» [23, 24]. Следовательно, фармакологическая модификация эпилептогенеза очевидно может препятствовать формированию патологически-измененного ГМ и развитию самого заболевания.

1.1 Современные взгляды на механизмы эпилептогенеза

Первичное повреждение головного мозга в виде эпилептического статуса, травматического повреждения, нейроинфекции или ишемической атаки способно запускать сложный каскадный процесс эпилептогенеза [23, 24]. Необходимо подчеркнуть, что первичные провокационные факторы, продолжающие воздействие на ЦНС и на фоне уже сформированного

судорожного синдрома самым негативным образом влияют на его хронизацию, учащение приступов и утяжеление течения эпилепсии [24]. Вследствие первичного повреждения развиваются две последовательные патофизиологические фазы в развитии заболевания: а) острая фаза, которая длится в течение от нескольких часов до нескольких недель, и объединяет такие явления как нейродегенерацию, элевацию воспалительной активности и транскрипционные события; б) хроническая фаза – длится в течение нескольких месяцев и характеризуется последовательностью событий, как правило включающих нейрогенез, разрастание мшистых волокон, реорганизацию нейрональных сетей и глиоз [25].

Причем, установлена корреляция между разрастанием мшистых волокон в тех областях ГМ, где они никогда не существовали и судорожной активностью. Помимо этого, установлена абберантная локализация зернистых клеток в зубчатой борозде ГМ (так называемые эктопические клетки-зерна). Эти клетки вследствие образования патологических связей с нейронами молекулярного слоя зубчатой борозды и нейронами СА3 слоя гиппокампа, принимают участие в формировании имеющих патологическое значение возбуждающих кругов повышенной судорожной активности [26].

Помимо прочего, в прогрессировании эпилептогенеза большая роль принадлежит глиозу, поскольку астроциты способны продуцировать и высвободить целый ряд активных нейротрансмиттеров и модуляторов, в частности глутаминовую кислоту (глутамат), который, будучи основным возбуждающим нейротрансмиттером, играет ключевую роль в эпилептогенезе и запуске эпизодов судорожного синдрома [25]. Несмотря на то, что первичный триггер (например, острая ишемическая атака) приводит в конечном счете к повышению количества вновь образующихся нейронов, нейрогенез в гиппокампе значительно снижается параллельно с формированием хронической эпилепсии, что также рассматривается как одна из нерешенных научных проблем, требующих самого внимательного рассмотрения [25].

Стадии эпилептогенеза могут быть хронологически ассоциированы с генетическими модификациями в виде изменения экспрессии различных генов. Интересно, что в течение эпилептогенеза целый ряд генов самым драматическим образом изменяют свою экспрессию. К таким генам относятся, например, гены mTOR (мишень для рапамицина у млекопитающих), инсулиноподобного фактора роста 1, трансформирующего фактора роста бета, p38 MAPK (тирозиновая протеинкиназа митоген-активирующего протеина p38) и Jak-STAT (молекула – трансдюсер сигнала янус-киназы и активатор белков транскрипции) [26].

1.2 Влияние антиконвульсантов на процесс эпилептогенеза

Противоэпилептические лекарственные средства (антиконвульсанты) применяются в клинической практике для контроля судорожной активности в течение уже многих десятилетий с доказанной клинической эффективностью у 65-70% пациентов, как мы уже упоминали выше [27]. Интересно, что помимо травматической болезни ГМ, нарушения мозгового кровообращения и первичного эпилептического статуса, эпилептогенный потенциал антиконвульсантов практически не изучался ни в эксперименте, ни в клинике [27].

Говоря, о травматическом повреждении ГМ, следует отметить, что профилактическое назначение карбамазепина, фенобарбитала, фенитоина или препаратов вальпроевой кислоты в клинической практике для предотвращения формирования посттравматической эпилепсии не увенчалось успехом [28].

Подобные же неутешительные результаты профилактики формирования хронического судорожного синдрома получили подтверждение при использовании диазепама и фенобарбитала в случае с развитием первичного эпилептического статуса, а также при назначении фенитоина и препаратов

вальпроевой кислоты у пациентов неопластическими процессами головного мозга [28].

С другой стороны, перспектива антиэпилептогенного действия указанных молекул была обоснована в целой серии экспериментальных исследований с использованием различных животных моделей эпилепсии – моделей пост-статуса, индуцированного пилокарпином, каинатами или электрической стимуляцией определенных областей головного мозга животных (гиппокампуса или амигдалаидных ядер) [29].

Фундаментальным вопросом здесь является следующий: оправдана ли клинически необходимость профилактического назначения антиконвульсантов пациентам с высоким риском формирования первичной и вторичной эпилепсии, например, после дебюта заболевания с эпилептического статуса [22] или после перенесенной нейроинфекции [30]. Профилактическое лечение с использованием антиконвульсантов может быть использовано клинически только в тех случаях, когда имеют место маркеры эпилептогенеза. Это утверждение нашло доказательство в случае с пациентами с малярией с поражением ГМ у детей, у которых в 10% формировался судорожный синдром и появлялись признаки эпилептогенеза [30].

Нейропротекторный потенциал противосудорожных лекарственных средств был проиллюстрирован и широко обсужден в целом ряде экспериментальных исследований у грызунов на модели эпилептического статуса [22]. Так, например, диазепам в высоких и низких дозах, габапентин, прегабалин, топирамат или вальпроаты снижали судорожную активность уязвимых областей головного мозга экспериментальных животных, перенесших эпилептический статус. В то же время, превентивный противосудорожный потенциал таких препаратов, как карбамазепин и фенитоин не нашли экспериментального подтверждения.

Как уже упоминалось выше, нейродегенерация представляет собой одно из неотъемлемых звеньев эпилептогенеза. В этой связи не раз в научной периодике высказывалась идея о том, что замедление глубины и

интенсивности нейродегенеративных процессов под действием психометаболических модуляторов (нейропротекторов) может существенным образом повлиять на частоту и тяжесть судорожных пароксизмов. Если говорить об экспериментальных критериях эффективности потенциальных противосудорожных лекарственных средств, то критерием абсолютной эффективности может служить полное отсутствие судорожной готовности после немой паузы, следующей за статусом, в то время как в контрольных сериях существенная судорожная активность формируется. Введение животным противосудорожных в течение времени от 2 суток до нескольких недель после (а в случае с фенобарбиталом – до 117 суток) перенесенного эпилептического статуса не приводило к однозначным оптимистическим выводам.

Так, в частности, по данным одних исследователей введение препаратов вальпроевой кислоты в высшей терапевтической суточной дозе в течение 40 суток после каинатного эпилептического статуса у крыс предотвращало формирование нейродегенерацию гиппокампа и полностью подавляло спонтанную эпилептическую активность [22]. Однако, другая исследовательская группа в опытах на крысах, у которых эпилептический статус инициировали пилоткрапином, показала, что введение вальпроатов в суточной дозе 600 мг/кг в течение 3 недель не приводит ни к формированию нейропротекторного, ни к развитию профилактического противосудорожного действия [22].

В это же время третий научный коллектив, проводивший опыты на модели электрически-индуцированного эпилептического статуса (стимулировали базальные ядра у крыс), показал, что введение крысам вальпроевой кислоты в дозе 600 мг/кг в сутки в течение 4 недель после формирования статуса позволило достичь доказательного уровня развития нейропротективного эффекта в отношении уязвимых областей гиппокампа, в то же время не сопровождавшегося никаким противосудорожным эффектом [22]. Некоторый протекторный эффект габапентина по редукции вторичной

судорожной активности и прегабалина в виде увеличения латентного периода развития спонтанных судорог был установлен в опытах на крысах после химически-индуцированного эпилептического статуса [22]. При этом, многие известные и широко клинически применяемые противосудорожные средства, а также новые антиконвульсанты, показали неэффективность на описываемой модели.

В то же время, внутривенное однократное введение диазепама в дозе 2 мг/кг через 2 часа после эпилептического статуса, индуцированного электрической стимуляцией базальных ядер, статистически значимо снижало долю животных со спонтанной судорожной активностью [22]. Кроме того, в экспериментах на самках крыс моделировали литиево-пилокарпиновую эпилептическую атаку и проводили регистрацию спонтанной судорожной активности в течение 7 суток между 8 и 9 недель после первичного статуса. Внутривентральное введение фенобарбитала в дозе 15 мг/кг в течение 2 недель дважды в сутки позволило существенным образом снизить частоту судорожной активности в среднем с 7,5 до 1 эпизода в неделю [31].

Другим позитивным примером может быть леветирацетам (лиганд синаптического транспортного протеина SV2A), вводимый мышам внутривентрально в высокой дозе 500 мг/кг два раза в сутки в течение 4 недель после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса [32]. Наблюдение осуществляли на протяжении четырех недель после формирования патологии. Было установлено, что при таком способе и режиме введения вещество эффективно снижает как частоту формирования спонтанной судорожной активности, так и приводит к формированию значимого нейропротекторного эффекта и редуцирует смертность животных [32].

Несмотря на то, что ингибиторы потенциал-зависимых натриевых каналов (карбамазепин и фенитоин) не обладают позитивным влиянием в отношении предотвращения эпилептогенеза, представители третьего поколения препаратов данного класса (например, эсликарбазепин) помимо

блокады натриевых каналов также эффективно ингибирует проведение по потенциал-зависимым кальциевым каналам Т-типа [33]. Применение препарата в опытах на мышах с пилокарпиновой эпилепсией сопровождалось предотвращением эпилептогенеза. Эсликарбазепин вводили одной группе животных в дозе 300 мг/кг внутривенно 1 раз в неделю, второй группе – в дозе 150 мг/кг – в течение 6 недель. В результате спонтанная судорожная активность, регистрируемая через 8 недель после формирования экспериментальной патологии, статистически значимо уменьшалась, также как редуцировалось разрастание мшистых волокон [34]. Полученные результаты послужили лабораторным доказательством высокого потенциала потенциал-зависимых кальциевых каналов Т-типа как мишени для разработки новых эффективных противоэпилептических лекарственных средств. Вместе с тем, для подтверждения научной гипотезы требуется проведение более глубоких доклинических исследований. Любопытно, что использование другого ингибитора потенциал-зависимых кальциевых каналов Т-типа этосуксимида в дозах 25 и 50 мг/кг в подобных экспериментальных условиях не приводило к формированию значимого терапевтического эффекта [33, 34].

Ламотриджин является относительно новым противосудорожным лекарственным препаратом из класса блокаторов потенциал-зависимых кальциевых каналов [33]. В отношении данного препарата также имеются результаты экспериментальных исследований, подтверждающие его способность подавлять активность AMPA глутаматных каинатных рецепторов в высоких фармакологических концентрациях [35]. Однако в недавно проведенных исследованиях группой ученых во главе с Fukushima удалось показать, что действующее вещество лекарственного средства блокирует также и NMDA глутаматные рецепторы [36].

Интраперитонеальное введение препарата крысам через 24 часа после формирования литий-пилокарпин – индуцированной эпилепсии в дозах 10 и 20 мг/кг ежедневно в течение недели статистически достоверно снижало частоту спонтанной судорожной активности животных, оцениваемое на 5 и 6

неделях эксперимента. Профилактическое введение ламотриджина позволяло предотвращать явления нейродегенерации в гиппокампе, а также астроглиоз [37]. В тех же самых лабораторных условиях этосуксимид не показал никакой фармакологической активности [37].

1.3 Антиэпилептогенный потенциал лекарственных препаратов, не проявляющих противосудорожных свойств

Доказательство антиэпилептогенного потенциала зарегистрированных лекарственных средств, не обладающих собственной противосудорожной активностью, представляется весьма перспективным, поскольку может сэкономить временные и финансовые ресурсы, необходимые для создания и регистрации новых лекарственных веществ.

Исследования показали, что подобные лекарственные препарат представлены довольно широко. Одним из них с весьма многообещающим спектром является блокатор рецепторов 1 типа ангиотензина II лозартан. Этот антигипертензивный препарат был изучен на модели вторичной эпилепсии у крыс, вызванной нанесением дезоксихолата натрия на поверхность головного мозга животных через специально сформированное отверстие в черепе [38]. В результате развивалась экстравазация альбумина из сосудистого русла вследствие сосудистой токсичности. Подобный процесс наблюдается при травматическом повреждении ГМ, нарушении мозгового кровообращения и нейроинфекциях [39-41]. В результате активизируется нейровоспалительный каскад, в котором ключевая роль отводится фактору некроза опухолей-бета (ФНО-бета) с последующим развитием эпилептиформных пароксизмов [42].

Лозартан вводили внутривентрикулярно в дозе 100 мг/кг через 40 мин после инстилляции дезоксихолата натрия с последующим поддержанием терапевтической концентрации препарата в плазме крови посредством его подачи с питьевой водой (в концентрации 2 г/л) в течение 3 недель. Спонтанная судорожная активность регистрировалась на протяжении 2 недель

с началом наблюдения через 7 дней после прекращения приема лозартана экспериментальными животными. Была установлена высокая антиэпилептогенная активность препарата, проявлявшаяся в значимом снижении частоты спонтанной судорожной активности – по сравнению с контрольными животными у 60 крыс в опытной группе судорожный синдром редуцировался. Контрастные различия между средней частотой судорожных паркосизмов – 8 в неделю в контроле и 2,5 в неделю в опытной группе – также послужили дополнительным доказательством наличия предполагаемого эффекта [38].

Авторы провели также еще одну серию экспериментов, в которой не происходило повреждение гематоэнцефалического барьера. При этом ученые перфузировали альбумин через ткань ГМ и регистрировали электрокортикограмму в течение 110 суток. У 85% животных регистрировались как минимум 2 эпизода судорожной готовности в течение 2 суток после перфузии альбумина, а среднее значение за неделю доходило до 6,08 в контрольной серии опытов. В группе животных, получавших лозартан доля животных с судорожной активностью снижалась до 25% на фоне уменьшения среднего числа эпизодов за неделю наблюдения до 0,23 [38].

Антиэпилептогенная активность лозартана также была подтверждена на каинатной модели эпилепсии у крыс [43]. Блокатор рецептора 1 типа ангиотензина вводили подкожно в дозе 10 мг/кг через 2 часа после начала эпилептического статуса и продолжали введение на протяжении 3 суток. Последующее поступление лозартана в организм экспериментальных животных в течение 4 недель проводили при помощи питьевой воды. Спонтанная судорожная активность регистрировалась в течение последующих 3 месяцев. Также оценивали неврологический и поведенческий дефицит наряду с морфологической оценкой гиппокампуса на предмет явлений нейродегенерации.

Было установлено, что профилактическое лечение лозартаном статистически достоверно повышало латентный период перед началом

судорожной активности и оказывало заметный нейропротективный эффект в отношении CA1 области гиппокампа лабораторных крыс. В других областях гиппокампа нейропротекция хотя и регистрировалась, но была менее выражена.

При проведении поведенческих тестов было установлено, что крысы, получавшие в качестве профилактического воздействия лозартан, отличались меньшим поведенческим дефицитом [43], в целом у них наблюдались менее выраженные поведенческие нарушения. Постановка подобного эксперимента на спонтанно гипертензивных крысах показала практически те же самые результаты за исключением отсутствия влияния терапии лозартаном на выраженность поведенческих расстройств [44].

Также антиэпилептогенная активность лозартана в виде увеличения латентного периода между воздействием стимулятора и началом судорожного синдрома была установлена на модели полных судорог вследствие стимуляции базальных ядер ГМ крыс [45]. Препарат вводили или в желудочки ГМ или в периферическую вену, что приводило к необходимости увеличения частоты подаваемых стимулов и силы стимулирующего тока, необходимых для индукции судорожного синдрома. Кроме всего прочего, в опытной группе не наблюдали повреждения гемато-энцефалического барьера. Вместе с тем, объективный анализ результатов показал, что лозартан не оказывал влияния на такие параметры как порог постсудорожного возбуждения, продолжительность и тяжесть судорожного синдрома [45].

Иммуносупрессор рапамицин по механизму своего действия блокирует mTOR комплекс 1, представляющий собой у млекопитающих сериновую / треониновую протеинкиназу, принимающую участие в синтезе нейронального белка [46]. Данный лекарственный препарат был изучен на каинатной (в дозе 10 мг/кг) модели эпилептического статуса у крыс при введении [47]. У животных, получавших препарат в суточной дозе 6 мг/кг в течение 4 суток наблюдали значимое сокращение частоты спонтанных судорог, возникающих после формирования эпилептического статуса и оцененных на 7 и 21 сутки

после начала эксперимента. Введение рапамицина в дозе 6 мг/кг в течение недели с последующим продолжением введения препарата в той же дозе через день еще на протяжении 6 недель после эпилептического статуса, индуцированного электрической стимуляцией углового пучка сопровождалось полным подавлением спонтанной эпилептической активности у 25% животных. У оставшихся 75% лабораторных крыс наблюдалось достоверное снижение частоты спонтанных судорог [48]. Терапевтическая активность сопутствовала значительному нейропротекторному эффекту в отношении гиппокампальной области ГМ, а также профилактикой повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Вместе с тем концентрация провоспалительных маркеров в рассматриваемой области ГМ крыс сохранялась на уровне контрольных животных [48].

Вместе с тем, в литературе имеются и обратные экспериментальные данные – об отсутствии антиэпилептогенного действия блокатора комплекса 1 mTOR. В частности, На модели пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса у мышей изучили эффективность введения рапамицина в дозе 10 мг/кг на протяжении 2 мес. Мониторинг спонтанной судорожной активности проводили через месяц после начала эксперимента в течение 1 мес., также оценивали разрастание мшистых волокон в зубчатой борозде. В результате, несмотря на сдерживание разрастания мшистых волокон и предотвращение гипертрофии зубчатой борозды, рапамицин не влиял на частоту спонтанной конвульсивной активности. Также препарат не профилактировал потерю клеточности некоторых областей ГМ животных. Частота судорожной активности регистрировалась на уровне 0,137 в контроле и 0,133 в час – в группе рапамицина [49]. Доказательность выводов была подтверждена большим объемом групп – по 64 мышей в каждой.

В подобном экспериментальном наблюдении, препарат давали животным в дозе 3 мг/кг в сутки – в два раза меньшей, чем в предыдущем опыте [50]. Исследователи также регистрировали заметную нейропротекцию

в виде ограничения разрастания мшистых волокон, гипертрофии зубчатой борозды, эктопической локализации клеток-зерен у 42% животных в опытной группе на фоне отсутствия противосудорожной активности [50].

Поиск антиэпилептогенных лекарственных средств может быть проведен и среди широкого спектра нестероидных противовоспалительных лекарственных средств (НПВС), подавляющих различные этапы формирования тканевого воспалительного ответа.

В частности, целекоксиб, блокатор циклооксигеназы 2 и HMGB1/TLR4 сигнального пути, был изучен в опытах на крысах после формирования у них литий-пилокарпинового эпилептического статуса [51]. Терапию начинали на следующий день после формирования эпилепсии в дозе 20 мг/кг внутривенно и продолжали в течение 28 суток, тем самым покрывая продолжительность латентного периода. Предварительная терапия целекоксибом статистически значимо снижала как частоту, так и длительность судорожной активности, регистрируемой между 28 и 42 сутками. Помимо этого, при оценке нейропротективного потенциала препарата, было установлено подавление aberrантного глиогенеза и нейрогенеза в областях гиппокампа [51].

N-ацетилцистеин в настоящее время применяется по следующим клиническим показаниям: коррекция ацетаминофен-ассоциированной гепатотоксичности, а также отхаркивающее секретолитическое и секретомоторное средство [52]. В основе антиоксидантной активности препарата лежит его химическая структура, позволяющая редуцировать продукцию предшественников глутатиона [52].

При внутривенном введении в дозе 30 мг/кг непосредственно после системного введения каиновой кислоты крысам для формирования эпилептического состояния N-ацетилцистеин через 12 недель повышал порог генерации судорог для хлорэтилового эфира и ингибировал разрастание мшистых волокон [53].

В другом эксперименте N-ацетилцистеин вводили животным внутрижелудочно в дозе 100 мг/кг в течение 5 недель после формирования травматического повреждения головного мозга крыс посредством жидкостного удара. Крысы, получавшие препарат не отвечали формированием судорог на внутрибрюшинное введение подпороговых доз пентилентетразола (30 мг/кг), которое у контрольных животных провоцировало генерализованные тонико-клонические судороги. Латентный период перед наступлением судорожного синдрома на фоне введения N-ацетилцистеин не отличался от интактных животных [54].

Представитель второго поколения тетрациклинов – моноциклин – с противовоспалительными и антиоксидантными свойствами проявляет антиэпилептогенную активность на модели литиум-пилокарпин-индуцированной эпилепсии в опытах на крысах [55]. Авторы исследования указывают, что условия постановки опыта приводят к пролонгированию активации астроцитов и клеток микроглии [56]. Миноциклин вводили в дозе 45 мг/кг в течение 2 недель после формирования экспериментальной патологии. Затем, через 6 недель после отмены препарата, спонтанные повторяющиеся судороги регистрировались в течение 2 недель. Авторы показали, что в исследовательской группе на фоне терапии миномицином частота, продолжительность и тяжесть судорожного синдрома значительно снижались. Также препарат проявил свойства ингибитора активации микроглии, продукции ФНО-альфа и ИЛ-1бета в СА1 области гиппокампа и пограничной коре ГМ лабораторных животных. В то же время ученые не отмечали влияния препарата на активацию астроцитарного клеточного пула [56].

В то же самое время, миномициклин оказался не способен предотвращать судорожную готовность ГМ животных с электрически-индуцированной патологией [57]. Однако у животных наблюдалось предотвращение формирования дефицита пространственной памяти и нормализация

локомоторной активности. При этом, у животных экспериментальной группы не наблюдали развития противовоспалительного эффекта [57].

1.4 Успехи комбинированной терапии судорожных расстройств

Принимая во внимание многоплановость и сложность механизма эпилептогенеза, ряд авторов выдвинули идею формирования эффективных фармакологических комбинаций, которые, с учетом механизма действия, могут быть клинически полезны. Одним из первых опытов формирования такой комбинации лекарств с антиэпилептогенным эффектом была комбинация леветирацетама (200 мг/кг внутривентрикулярно) и топирамата (30 мг/кг внутривентрикулярно) у мышей после введения каиновой кислоты в область гиппокампа [58] в течение 5 суток после индукции эпилепсии. Проводили одновременный видео- и ЭЭГ-мониторинг в течение недели через 4 и 12 недель после интравентрикулярного введения каиновой кислоты. Через 6 и 12 недель после запуска патологического процесса оценивали гистологическую структуру ГМ животных. Авторы отдельно регистрировали электрографические (наблюдаемые только посредством регистрации ЭЭГ) и электроклинические судорожные состояния (совпадение мозговой абберрантной активности при видеофиксации двигательной активности животных и ЭЭГ регистрации биопотенциалов), отметив, что первый вариант наблюдался гораздо чаще.

Было установлено, что комбинированное лечение очень эффективно в редукации частоты спонтанных рекуррентных электроклинических судорожных пароксизмов – до 80% по сравнению с животными контрольной группы. Число животных со спонтанной электроклинической активностью также снижалось, что показывало полную фармакологическую протекцию части животных в группе. Более того, тяжесть электроклинических пароксизмов также снижалась на фоне экспериментальной терапии, что выражалось в меньшей генерализации (стадии 4 и 5 по шкале Racine). Однако,

электрографическая активность не менялась на фоне комбинированного лечения мышей леветирацетамом и топироматом; также не было установлено достоверных нейропротекторного и противовоспалительного эффектов лечения.

Вторая комбинация лекарственных средств с антиэпилептогенным действием, изученная экспериментально, состояла из фенobarбитала, вводимого животным по схеме: 25 мг/кг внутривенно в виде болюса с последующим введением в дозе 15 мг/кг 3 раза в сутки, и леветирацетама в той же дозе, что и в предыдущем эксперименте. Постановка опыта не привела к появлению надежного профилактического эффекта [58].

На той же самой модели эпилептического статуса у мышей были изучены разнообразные комбинации лекарственных средств, состоящие из 2, 3 или даже 4 компонентов [59]. Наиболее эффективной комбинацией было сочетание леветирацетама в дозе 60 мг/кг внутривенно, аторвастатина в дозе 3 мг/кг и цефтриаксона в дозе 60 мг/кг. Регистрировали снижение частоты электроклинических судорог на 80% по сравнению с контролем на фоне уменьшения их количества у животных (до 60%). При этом авторы не отмечали влияния комбинации на прогрессию нейрональной дегенерации в области гиппокампа [59].

1.5 Противосудорожные эффекты веществ с антиоксидантными свойствами

Ресвератрол, представляющий собой природный фитоалксин, содержащийся в винограде и некоторых других растительных продуктах, обладает высоким антиоксидантным потенциалом [60]. Помимо антиоксидантной активности вещество также демонстрирует противовоспалительную и противоопухолевую активность [61]. На модели каинатной эпилепсии у крыс ресвератрол ингибировал спонтанную судорожную активность [62] – снижал частоту развития судорог с 75% в

контрольной до 14,3% в опытной группе. Также было показано, что вещество оказывает нейропротекторный эффект в отношении CA1 и CA3a областей гиппокампа, ингибирует разрастание мшистых волокон [62]. Также противосудорожный эффект вещества был установлен на модели пентилентетразольной эпилепсии, сопровождавшийся развитием противовоспалительного эффекта в ГМ, сопутствующего судорожному синдрому [63].

Другое природное вещество – куркумин – в опытах в культуре клеток показал противовоспалительное и нейропротекторное действие [64]. В то же время в опытах на крысах с электрически-стимулированной судорожной активностью не удалось подтвердить установленного нейропротекторного эффекта [64]. Однако, на модели каинатной эпилепсии у крыс, введение вещества, хотя и не влияло на частоту развития судорог, значительно снижало их тяжесть на фоне улучшения когнитивных функций лабораторных животных [65].

Биоактивные фитопродукты сульфорафаны представляют собой активаторы факторов транскрипции (в частности, ядерного эритроид-зависимого фактора 2, Nrf2), активирующих внутриклеточную сигнализацию защитного – цитопротекторного – характера [66]. Научная группа Pauletti и соавт. вызывала формирование эпилептического статуса у крыс посредством электрической стимуляции вентральных областей гиппокампа и затем вводила животным внутрибрюшинно комбинацию сульфорафана в дозе 5 мг/кг и N-ацетилцистеина в дозе 500 мг/кг в течение 7 суток.

Было установлено, что комбинированная экспериментальная антиоксидантная терапия подавляла прогрессию эпилептогенеза, измеряемую между 2 и 5 мес. эксперимента, что проявлялось в существенном снижении частоты спонтанных судорог. Также комбинированная терапия позволила предотвратить формирование нейродегенерации и повысить когнитивную активность животных. Наконец, применение двух антиоксидантов позволило предотвратить гиперэкспрессию молекулы нейровоспаления – HMGB1 (high

mobility group box 1), что внесло дополнительный вклад в реализацию антиэпилептогенного действия комбинации [67].

1.6 Новые соединения с противосудорожной активностью

Одним из актуальных вопросов при создании новых противоэпилептических средств было значение блокады обоих сигнальных путей mTOR в реализации изучаемого эффекта. Для проверки этой гипотезы на модели каинатной (вводили в гиппокамп) эпилепсии у мышей изучили соединение 1,3,5-триазина с лабораторным шифром PQR620 [68]. Соединение вводили в течение 2 недель, после чего спустя 6 недель оценили эффективность экспериментальной терапии. Авторам не удалось зарегистрировать протекторного эффекта вещества в отношении эпизодов спонтанной судорожной активности. Также не было установлено влияние соединения на распространение клеток-зерен в зубчатой борозде. Единственным терапевтическим эффектом было значительное снижение уровня тревожности экспериментальных животных. В тех же экспериментальных условиях другой дериват 1,3,5-триазина с лабораторным шифром PQR530 показал подобные результаты [68].

Антагонист кальциевых каналов Т-типа Z-944 также был изучен на модели каинатной эпилепсии у лабораторных крыс [69]. Вещество вводили при помощи специально сконструированной помпы, позволяющей проводить непрерывную подкожную инфузию вещества в дозе 60 мг/кг в сутки в течение 4 недель. Через 4 недели после прекращения экспериментального лечения в течение 2 недель регистрировали возникновение спонтанных судорог и расстройств поведения (тревожность, депрессия, познавательная активность). В опытной группе отмечали сокращение частоты возникновения судорог до 0,01 в день по сравнению с контролем (0,8 в сутки). Лечение антагонистом кальциевых каналов Т-типа Z-944 также сопровождалось улучшением памяти и поведения животных [69].

Интригующая гипотеза о роли метилирования ДНК в эпилептогенезе была выдвинута группой Williams-Karnesky. Ученые вводили аденозин в суточной дозе 250 нг в течение 10 суток в желудочки головного мозга крыс при помощи специального проводника. Экспериментальная терапия начиналась спустя 9 недель после внутрибрюшинной индукции эпилептиформного состояния с помощью каиновой кислоты в дозе 12 мг/кг. Спонтанная судорожная активность оценивалась между 10 и 13 и 18-21 неделями после введения эпилептогена. Аденозин при таком режиме и способе введения значительно снижал частоту судорожной активности в первый временной интервал и полностью подавлял последующий рост эпилептогенной активности во время второго этапа мониторинга эффекта. Также подавлялось разрастание мшистых волокон. Авторы связали полученный эффект с подавлением метилирования ДНК в уязвимых областях гиппокампа [70].

Весьма многообещающие результаты были получены при использовании антисмыслового олигонуклеотида антагомира (ANT-134), который таргетирует микроРНК-134. Эксперименты проводили у мышей, у которых эпилептическое расстройство воспроизводили при внутримозговом введении каиновой кислоты. ANT-134 вводили в дозе 30 мг/кг внутрибрюшинно через 2 часа после индукции расстройства с последующим ЭЭГ-мониторингом и регистрацией спонтанных судорог в течение 2 недель через 1, 2 и 3 мес. после формирования патологии. Было установлено, что введение олигонуклеотида позволяет достигать почти полной блокады судорожной спонтанной активности. Эффект сопровождался подавлением явлений астроглиоза в гиппокампе [71].

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) относится к группе нейротрофинов, участвующих в модуляции синаптической пластичности и, как следствие, в реализации многих функций ЦНС, например, таких, как память [72]. Повышенная судорожная активность ГМ сопровождается гиперэкспрессией и активацией рецептора BDNF, представляющего собой

тропомиозин-зависимую протеинкиназу В (TrkB), спаренную с фосфолипазой С-гамма 1 [73, 74]. В этой связи было высказано предположение, что ингибирование TrkB может иметь существенное значение в эпилептогенезе. Чтобы реализовать идею, была предпринята попытка генетиками и химиками. В частности, у лабораторных мышей дикого генотипа TrkB не чувствителен к 1-(1,1-диметилэтил)-3-(1-нафталенилметил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4 амину (1NMPP1). Однако, генетическое превращение в локусе TrkB (аланин замещается на фенилаланин в положении 616) трансформирует фермент в чувствительный к 1NMPP1 протеин, что позволяет оценить фармакологическую активность вещества на генетически-модифицированных лабораторных животных [74]. Ингибитор вводили внутрибрюшинно в дозе 16,6 мкг/г через 40 и 60 мин после внутримозгового введения эпилептогена – каиновой кислоты, а затем еженедельно через питьевую воду (в концентрации 25 мкМ). Через 2 недели лечения отменили введение 1NMPP1. Спонтанную судорожную активность измеряли ежедневно на 5 и 6 неделях через 8 недель после введения каиновой кислоты. Установили выраженный противозэпилептический эффект в долгосрочной перспективе, сопровождавшийся существенным снижением уровня тревожности мышей в тесте черно-белой камеры. Закономерно, никакого эффекта не было получено при подобной постановке опыта у немодифицированных животных [74].

Эксперименты на меодифицированных мышах также были проведены с иным провокатором эпилептогенеза – у животных с интервалом 8 суток проводили электрическую стимуляцию базальных ядер, приводившую к прогрессированию по продолжительности и тяжести судорожному синдрому. Ингибитор также вводили внутрибрюшинно в дозе 16,6 мкг/г внутрибрюшинно после первой эпилептогенной электрической стимуляции и далее каждые 12 часов до 5 инъекций, а затем в течение 2 суток через питьевую воду (в концентрации 25 мкМ). Оказалось, что введение 1NMPP1 приводит к сокращению на 50% продолжительности электрической судорожной активности, на 25% продолжительности локомоторных судорог и на 75%

снижение интенсивности пред- и постсудорожных поведенческих расстройств. Эти явления не наблюдались ни в контрольной группе животных, ни у мышей с диким генотипом.

Также в литературе имеется указание на изучение ингибиторного эффекта в отношении TrkB сигнального пути пептида pY816, который нарушает связывание рецептора с фосфолипазой С-гамма 1. При внутрибрюшинном введении пептида в дозе 20 мг/кг в количестве 5 инъекций после первой электрической стимуляции базальных ядер ГМ мышей наблюдалось полное предотвращение судорожного синдрома после второй электрической стимуляции, тогда как введение карбамазепина в дозе 20 мг/кг в течение 2 суток каждые 4 часа в качестве препарата сравнения не показало никакой эффективности [75].

1.7 Новые перспективные мишени для создания современных антиконвульсантов

Стимуляция нейронов ГМ активирует множество различных факторов и сигнальных систем посредством повышения экспрессии так называемых генов немедленного реагирования (IEG). Одним из таких генов, кодирующих белок *c-fos* весом 37,5 КДа, является ген *c-fos* [76, 77]. В этой связи, эпилептические пароксизмы у экспериментальных животных, индуцированные или электрической стимуляцией ГМ [78, 79] или широким спектром химических агентов (пилокарпин, каиновая кислота, пентилентетразол и др.), приводят к повышению экспрессии мРНК белка *c-fos* или других активных белков в областях ЦНС, наиболее уязвимых к воздействию (в течение нескольких минут после стимуляции) [80-86].

Активация *c-fos* носит временный характер, зачастую переходя в латентную – асимптоматическую фазу эпилепсии, так называемую фазу затишья перед формированием рецидивирующего течения заболевания. Интересно, что у крыс на модели острой электросудорожной активности,

повышение экспрессии c-fos сменялось ее снижением ниже контрольных значений, причем это снижение приходилось на хронизацию судорожной активности [78]. Быстрая, но кратковременная индукция активности c-fos также была подтверждена и в срезах лобных долей человеческого ГМ, полученных при хирургическом вмешательстве на орган, на фоне эпилептогенной стимуляции [87-93].

Таким образом, сопоставляя фармакологические эффекты противосудорожных агентов – зарегистрированных в качестве лекарственных средств или находящихся на тех или иных этапах изучения, можно выделить потенциально обладающие антиэпилептогенной активностью и вещества, лишенные этого вида действия.

Что касается механизма действия средств с антиэпилептогенным эффектом, то они, главным образом взаимодействуют в трех основных направлениях в ЦНС: потенциал-зависимые натриевые и кальциевые каналы, система ингибирования ГАМК_A-рецепторов и глутамат-опосредованная эксцитотоксичность [28, 33].

ГАМК_A-рецептор может рассматриваться как наиболее привлекаемый таргет для антиэпилептогенных лекарственных средств, поскольку диазепам, будучи позитивным модулятором ГАМК_A-бензодиазепинового рецепторного комплекса при однократном введении в высокой дозе 20 мг/кг наиболее активно ингибирует спонтанную судорожную активность в ответ на экспериментальный эпилептогенез у животных, индуцированный электрической стимуляцией базальных ядер [94]. Вальпроаты, антиэпилептические лекарственные средства с многовекторным механизмом действия, также вмешиваются в ГАМК-ергическую регуляцию функций ЦНС и повышают трансформацию ГАМК в регионах ГМ, ответственных за формирование судорожной активности и ее распространение [95].

Однако лишь в некоторых, но далеко не всех, литературных источниках подтверждена антиконвульсивная – антиэпилептогенная активность производных вальпроевой кислоты. Как показал анализ доступных

исследований, различные факторы (метод моделирования эпилептической активности, дозы, ритм, путь введения) могут существенно отражаться на формирующемся терапевтическом эффекте препаратов. Кроме того, фенobarбитал, позитивный модулятор подавляющей ГАМК_A-рецепторной системы [33], обладает противосудорожной активностью у крыс на модели литиево-пилокарпинового эпилептогенеза [31], несмотря на то, что на других моделях эпилепсии препарат не показал эффективности даже в комбинации с леветирацетамом [58].

Множество антиоксидантов показали высокий антиэпилептогенный потенциал в экспериментальных исследованиях, что послужило основой активного поиска возможных механизмов реализации этого фармакологического действия антиоксидантов. Так, ресвератрол, препарат с широкой антиоксидантной активностью проявляет свойства за счет снижения продукции свободных радикалов и повышения активности ферментов – антиоксидантов – супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [61]. Также очевидно, что антиоксидантные свойства препарата очень близки к противовоспалительному действию вещества, поскольку свободные радикалы активируют воспалительную реакцию, поддерживают на высоком уровне ее обороты [96].

И в самом деле, препарат является мощным супрессором микроглия-индуцированного воспаления в ЦНС и последующего повреждения ткани ГМ воспалительного происхождения. Возможно, противовоспалительная активность препарата обусловлена подавлением синтеза и высвобождения провоспалительных медиаторов [61].

Сульфорафаны также эффективны с точки зрения ингибирования эпилептогенеза, и их антиоксидантная активность ассоциирована с Nrf2, ответственного за активацию широкого спектра генов – антиоксидантов [66]. Помимо повышения экспрессии Nrf2 сульфорафаны также подавляют секрецию провоспалительных цитокинов, и, в частности, ядерного фактора каппа В [97].

N-ацетилцистеин, показывающий антиэпилептогенные свойства в комбинации с сульфорафанами, является прямым антиоксидантом [98]. Другие вещества с антиоксидантной активностью, так как куркумин, миноциклин либо в виде монотерапии, либо в комбинации с иными препаратами в той или иной степени демонстрируют антиэпилептогенную активность, что свидетельствует о важной роли, которую играют свободные радикалы в формировании эпилептогенной активности ГМ [99].

Большие надежды в области реализации антиэпилептогенного потенциала вселяют противовоспалительные лекарственные средства. Так, в частности целекоксиб существенно снижает негативные последствия моделирования эпилептогенного состояния у крыс, таких как рецидивирующие судорожные пароксизмы, гиппокампальная нейродегенерация, аберрантный нейрогенез и глиоз в уязвимых областях головного мозга лабораторных грызунов [51]. Предположительной мишенью фармакологического действия целекоксиба в рассматриваемом контексте может быть ингибирование нейровоспалительных реакций.

Кроме того, к настоящему времени накапливается все больше доказательств вовлеченности m-TOR комплекса в формирование эпилептогенного потенциала ЦНС. Однако данные об активности рапамицина довольно противоречивы. Ряд авторов высказал предположение, что источником противоречивых данных могут быть особенности фармакокинетики препарата. Так, в частности, 50% действующего вещества накапливается в головном мозгу лабораторных крыс с последующим поддержанием концентрации посредством добавления вещества в питьевую воду. Возможно, этого недостаточно для реализации надежного экранирования ГМ от эпилептогенной активации [100]. В этой связи высокий эффект экспериментальной терапии рапамицином вносит свой существенный вклад в понимание описываемой проблемы [57-59, 60].

Серьезная научная дискуссия разворачивается также вокруг потенциал-зависимых кальциевых каналов T-типа: насколько справедливо связывать

эпилептогенную активность в ГМ с активностью этих каналов. Полученные доказательства эффективности антагонистов потенциал-зависимых кальциевых каналов Т-типа в экспериментальной терапии судорожного синдрома на различных моделях эпилепсии поддерживают высокий интерес к этой группе лекарственных средств.

Дополнительными доказательствами справедливости такого интереса может служить установленная у кальциевых блокаторов способность сдерживать нейродегенеративную трансформацию базальных ядер, гиппокампа и других уязвимых областей головного мозга [101]. Однако, зерно сомнений произрастает из совершенно противоположных результатов, полученных в экспериментальных исследованиях другого представителя класса – этосуксимида [101]. Очевидно, что особенности взаимодействия различных ингибиторов с различными потенциал-зависимыми кальциевыми каналами Т-типа могут отчасти объяснить их противоположно направленную фармакодинамику [102].

Экспрессия микроРНК может широко варьировать при различных заболеваниях и состояниях, в том числе и при эпилепсии. Так, в частности, было установлено, что тканевой уровень микроРНК-129-2-3p был существенно повышен как в плазме крови, так и в кортикальной области ГМ пациентов с эпилепсией височной доли головного мозга [103]. В последнее время было показано, что микроРНК-129-2-3p вмешивается в функциональную активность ГАМК_A-бензодиазепинового рецепторного комплекса в нейронах гиппокампа крыс на модели эпилептогенеза, индуцированного внутримозговым введением каиновой кислоты [104].

Кроме того, ингибирование микроРНК-134 у крыс с той же формой эпилепсии существенно улучшало клиническое течение экспериментальной патологии у лабораторных животных на фоне морфологически подтвержденной нейропротекции. Авторы также связывают положительный эффект снижения микроРНК-134 с нормализацией клеточного состава СА3 области гиппокампа крыс [105].

Как мы уже говорили c-fos имеет большое значение в понимании природы эпилептогенеза и последующем создании эффективных противосудорожных лекарственных препаратов. Комплекс повышает метилирование гистонного белка H4 в ГМ [106, 107]. В связи с чем, широкий спектр ингибиторов метилирования ДНК (деметиляторов) показали неплохую противосудорожную активность в условиях эксперимента [108-110].

В связи с чем представители класса могут служить объектом подробного изучения и поиска потенциально активных молекул [111-116].

В целом, поиск перспективных противосудорожных лекарственных средств, обладающих способностью не только управлять конвульсивной активностью, но и модифицировать процессы эпилептогенеза в ГМ, представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной нейрофармакологии и психофармакологии. Вот почему в качестве объекта изучения и области для исследования мы выбрали представителей класса соединений аминосульфоновой кислоты.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование посвящено обоснованию антиконвульсивной активности двух оригинальных металлосодержащих замещенных соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты, у которых ранее было выявлено антиишемическое, противовоспалительное действие при транзиторном нарушении мозгового кровообращения в эксперименте, а также способность предотвращать нейродегенеративные процессы в ЦНС на экспериментальной модели бокового амиотрофического склероза. Этот комплекс установленных фармакологических эффектов, а также понимание ряда механизмов действия соединений привели нас к мысли о том, что помимо описанных в спектре терапевтических эффектов магниевого и цинкового дериватов сульфокетокислоты может присутствовать и противосудорожный.

Развитие судорожного синдрома, повышенной возбудимости моторных и иных зон головного мозга является, как известно, следствием целого комплекса этиологических и патогенетических факторов. Ведущими среди них являются ишемические, травматические, токсические, инфекционные поражения ЦНС, ведущие к формированию морфологических изменений и перестроек клеточного ландшафта структур головного мозга, запуск внутриклеточных сигнальных механизмов повышения возбудимости и сетевое закрепление подобной активности.

Указанные обстоятельства обуславливают методологические сложности, встающие перед исследователем при планировании работы по изучению новых фармакологических веществ. С одной стороны, важно воспроизвести проявление патологического состояния – судорожный синдром, но, при этом не менее важно, смоделировать экспериментальный эпилептогенез таким образом, чтобы можно было оценить и морфологические, молекулярные механизмы и точки приложения потенциального фармакологического агента. Вот почему при планировании настоящей

работы, построении ее дизайна мы воспользовались двумя моделями эпилептогенеза, описанными в зарубежной литературе как наиболее адекватные, позволяющие провести комплексное изучение особенностей реализации противосудорожного действия веществ.

2.1 Дизайн диссертационного исследования

На рисунке 1 представлен дизайн настоящего диссертационного исследования. Работа включала три последовательных этапа.

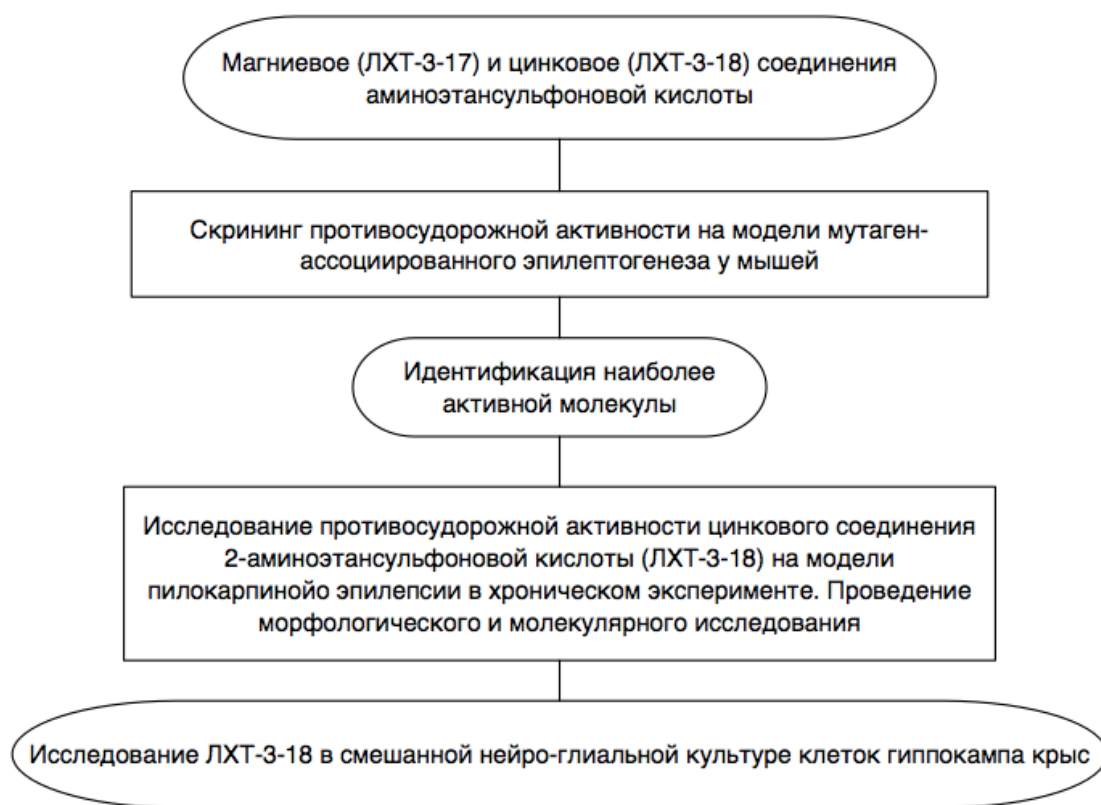


Рисунок 1 – Дизайн экспериментального исследования

На первом этапе оба соединения были изучены на модели генетически-детерминированной эпилепсии у мышей в скрининговом режиме при курсовом внутрибрюшинном введении магниевой и цинковой солей 2-аминоэтансульфононой кислоты в дозах, составляющих 2,5% от показателя ЛД₅₀, определенного для мышей. По результатам выполнения этапа было

отобрано одно вещество с наибольшей противосудорожной активностью для продолжения проведения экспериментальных исследований.

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

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

Аналитический этап включал обработку и статистический анализ полученных экспериментальных данных.

2.2 Соблюдение принципов биоэтики и гуманного обращения с животными при выполнении исследования

Дизайн, аннотация и протокол настоящего экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на заседании от «09» декабря 2021 года №22-21

Исходя из современных принципов проведения исследований с участием лабораторных животных, в своей работе мы основывались на основных положениях следующих нормативных правовых и регулирующих актов Российской Федерации и международных актов:

1. Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 г. №61-ФЗ в действующей редакции;
2. «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах или иных научных целях» (Страсбург, 1986) с

изменениями, предусмотренными положениями Протокола Совета Европы от 05.12.2005 г. (СЕД №170);

3. Директивой Европейского Союза от 24 ноября 1986 г. о сближении Законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ ЕЕС);

4. Приказа Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» в действующей редакции;

5. ГОСТа 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт Российской Федерации);

6. ГОСТа 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, соответствующий «Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits») от 01.07.2016 г.;

7. Методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени / Р.С. Мирзоян и др. – М.: Гриф и Ко, 2012.

Все манипуляции с лабораторными грызунами, включая условия их содержания, а также лабораторные процедуры (забор материала, маркировка образцов, хранение материала, выполнение исследований, ведение записей, утилизация образцов и архивирование) выполнялось в строгом и неукоснительном соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП) лаборатории экспериментальной медицины Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Выведение экспериментальных грызунов из эксперимента проводили под эфирным наркозом.

2.3 Общие сведения об исследуемых в работе соединениях 2-аминоэтансульфоновой кислоты и препаратах сравнения

Объектом исследования в представленной работе были два соединения сульфокетокислоты – 2-аминоэтановой кислоты, синтезированные в лаборатории химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО ВНЦ БАВ (Россия, г. Старая Купавна Московской области)¹: магния бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-317) цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318). В этом же учреждении был предложен способ синтеза соединений, защищенный патентом Российской Федерации [117].

На рисунке 2 представлены химические структуры исследуемых соединений.

В качестве референсного противосудорожного препарата (препарата сравнения) на всех выбранных моделях эпилептогенеза использовали производное дибензазепина карбамазепин в виде субстанции (Carbamazepine C2040, Merck Sigma-Aldrich, Германия) с чистотой более 98% в силу того, что препарат с доказанной противоэпилептической активностью, подавляет глутаматергическую эксайтотоксичность, позитивно влияет на когнитивную и эмоциональную сферу в эксперименте и клинике [118, 119].

При выборе доз исследуемых соединений и референтного препарата с противосудорожным эффектом руководствовались имеющимися результатами проведения токсикологических исследований (для соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты – данные Громовой И.А., 2019, Крайновой Ю.С., 2020 и Семелевой Е.В., 2021) [17-19], а также данными об оптимальных клинических дозах карбамазепина с учетом правил межвидового

¹ Выражаем большую признательность руководителю отдела химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО ВНЦ БАВ доктору химических наук профессору С.Я. Скачиловой за предоставленные для исследования субстанции соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты

биологического переноса доз [118].

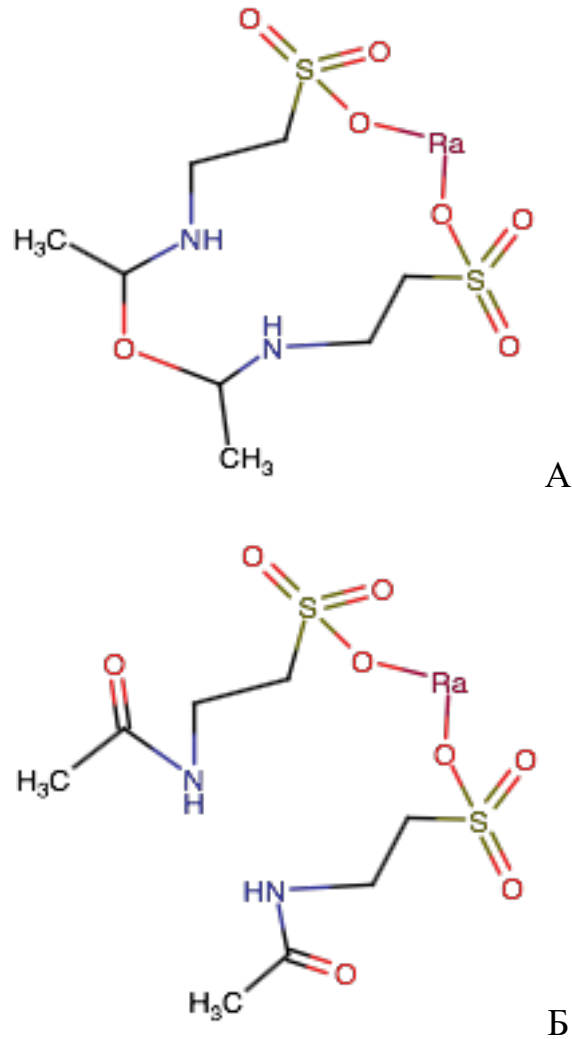


Рисунок 2 – Структурные формулы изученных веществ: А – цинковая соль (ЛХТ-318), Б – магниевая соль (ЛХТ-317)

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 полном соответствии с требованиями к объемам вводимых внутрижелудочно жидкостей в зависимости от вида лабораторных животных [120]. Введение проводили бодрствующим животным при помощи специальной иглы для кормления производства World Precision Instruments (США).

2.4 Лабораторные животные и условия их содержания.

Принципы формирования экспериментальных групп

В разделе настоящего диссертационного исследования, выполненном на лабораторных животных, применяли грызунов трех видов: лабораторных крыс обоего пола 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. академиком 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).

Содержание животных и лабораторные манипуляции с их участием проводили в строгом соответствии с «Международным рекомендациям (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), а также требованиями национального регулятора к выполнению медико-биологических исследований с участием животных.

После поступления в виварный комплекс ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), все животные осматривались ветеринаром, оценивался их внешний вид, общее состояние, после чего мышей и крыс изолировали в полимерные клетки, снабженные поилками и устройствами для кормления, по 3-5 особей в каждой, на 14 суток. В течение карантинного периода не отмечали гибели животных. После повторного осмотра животных переводили в общее отделение вивария для последующего использования в эксперименте.

Животные находились на естественном световом режиме при следующих параметрах микроклимата: температура окружающей среды – 20⁰С, влажность воздуха – 55-60%. Кормление мышей и крыс осуществляли сухим сбалансированным гранулированным кормом производства, приготовленным по стандартной рецептуре, производства АО «Лабораторкорм» (Москва). Животные потребляли водопроводную воду. Подстил из стружки лиственных пород деревьев производства АО «Лабораторкорм» (Москва) меняли 1 раз в 10 дней.

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. Сведения о составе групп представлены в таблице 1.

На скрининговом этапе исследования были сформированы 4 группы животных: контрольная группа, в которой лабораторным мышам внутрь вводили только крахмальный клейстер, группа референтного противоэпилептического средства карбамазепина, а также две группы по 6 мышей в каждой, в которых животным внутрижелудочно вводили исследуемые соединения ЛХТ-317 и ЛХТ-318 в дозах, соответствующих 2,5% от показателя ЛД₅₀ при соответствующем пути введения.

На этапе изучения отсроченного эпилептогенного эффекта соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты в опытах на крысах были сформированы 5 групп по 6 животных в каждой: интактные животные, которым не воспроизводили экспериментальной патологии, группа контроля, группа

препарата сравнения и две опытные группы животных, получавших внутрижелудочно соединения ЛХТ-317 и ЛХТ-318 в дозах, соответствующих 2,5% от показателя ЛД₅₀ при соответствующем пути введения у крыс.

Таблица 1 – Структура и характеристика экспериментальных групп с участием животных

Экспериментальная модель эпилептогенеза	Вид животных	Группа, количество животных в ней
Модель эпилептогенного мутагенеза	Потомство G3 от мутировавших самок мышей С3Н/HeJ и С57Bl6 самца	Контроль, 6 Карбамазепин, 6 ЛХТ-317, 6 ЛХТ-318, 6
Модель пилокарпинового эпилептогенеза	Крысы Wistar	Интактные, 6 Контроль, 6 Карбамазепин, 6 ЛХТ-317, 6 ЛХТ-318, 6
Итого		Мышей – 24 Крыс – 30

2.5 Модель мутагенного эпилептогенеза

Модель аутосомно-рецессивного эпилептогенеза воспроизводили по методу, описанному Е.В. Борисовой и соавт. в 2017 году [121]. Для получения животных с повышенной судорожной готовностью головного мозга проводили последовательность экспериментов на мышах С3Н.

На начальном этапе половозрелым самцам мышей С3Н проводили трехкратную инъекцию мутагена – спиртового раствора нитрозозэтилмочевины (ENU) внутрибрюшинно с интервалом в 1 неделю. Для этого исходную субстанцию нитрозозэтилмочевины производства Merck

Sigma-Aldrich (ENU, каталожный номер N3385, Германия) разводили в 10 мл 96% этилового спирта и стабилизировали фосфатно-цитратным буфером в объеме 90 мл до pH 5,0. Вычисление необходимого объема спиртового раствора на одно введение мыши весом 18-22 г проводили исходя из известной дозы мутагена (80 мкг/кг) по следующей формуле:

$$V = 0,001 \times X + A/B,$$

где V – объем раствора на одну инъекцию, X – вес мыши (в граммах), A – доза нитрозозэтилмочевины в мкг/г веса животного, B – концентрация мутагена в растворе в мкг/мл.

Матричный раствор готовили в такой концентрации, чтобы объем вводимого раствора на одно животное не превышал 0,5 мл во избежание интоксикации этиловым спиртом.

В силу нестабильности и высокой светочувствительности раствора нитрозозэтилмочевины для каждого нового введения приготавливали свежий раствор вещества. После инъекций остатки раствора утилизировали. В течение 10-15 недель после трехкратных инъекций мутагена наблюдается период стерильности самцов с последующим заселением сперматогенных пространств клетками-предшественниками сперматогенеза, содержащими мутантный генотип. После чего самцы восстанавливают свою репродуктивную способность.

Для формирования аутосомно-рецессивной модели² ENU-индуцированного epileptogenesis использовали третью генерацию потомства самоцов СЗН, подвергнутых воздействию мутагена, при этом для повышения вероятности обнаружения рецессивных мутаций мутантного генотипа в потомстве третьего поколения мышей была применена схема обратного

² Выражаем огромную благодарность д.б.н. ведущему научному сотруднику лаборатории внутриклеточной сигнализации Е.А. Туровскому за предоставленных G2-самок для проведения финального обратного скрещивания и формирования экспериментальной модели

скрещивания самок G2 со своими отцами C57Bl6 по схеме, представленной на рисунке 3.

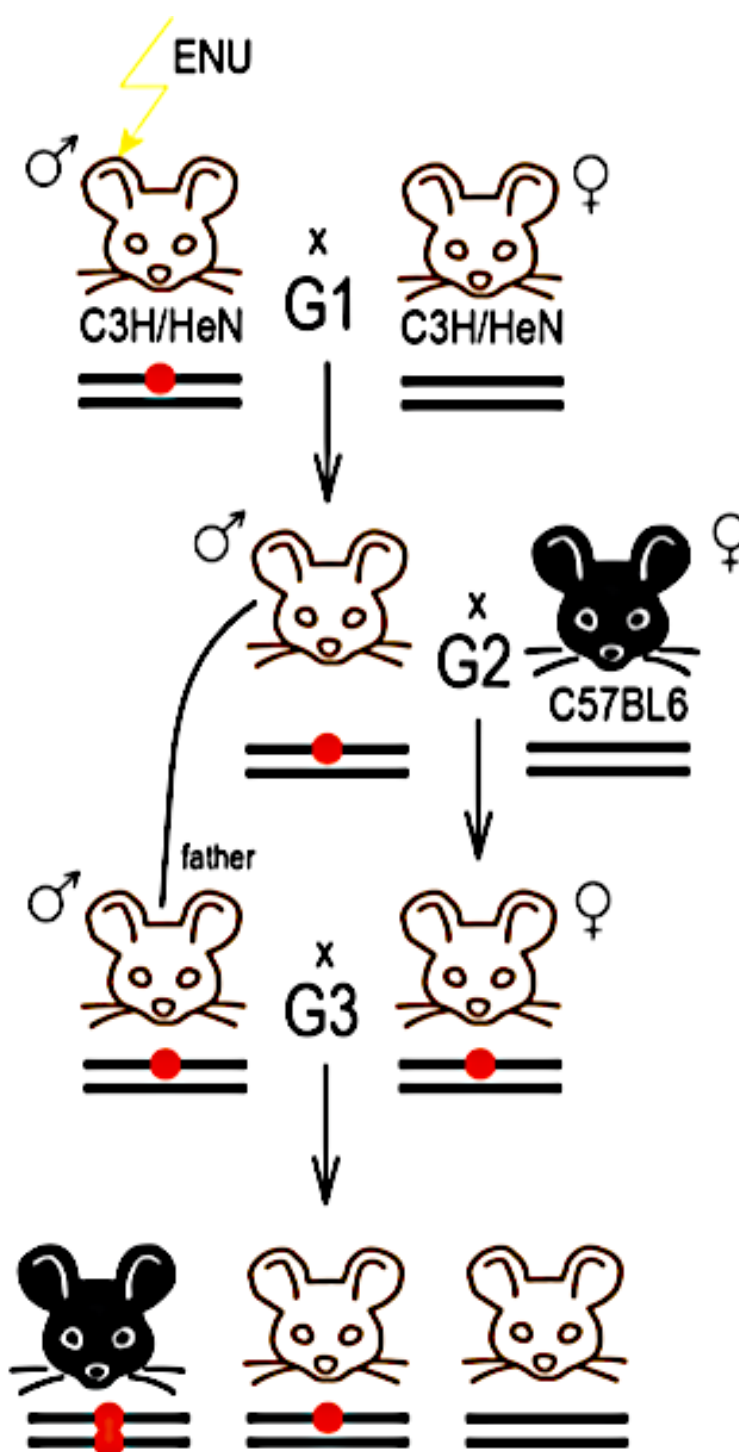


Рисунок 3 – Схема скрещивания мышей для формирования экспериментального ENU-индуцированного мутагенного эпилептогенеза по Е.В. Борисовой и соавт. [122]. Пояснения в тексте

Аудиогенный судорожный синдром является одной из наиболее адекватных животных моделей, отражающих реальную клиническую ситуацию генерализованных приступов у пациента с эпилепсией. Эта модель довольно широко применяется в экспериментальной нейрофармакологии для проведения скрининговых исследований. Именно эта модель была нами избрана в качестве базовой для исследования у мышей с ENU-индуцированным эпилептогенезом.

Интенсивность ответной реакции на звуковой раздражитель у животных варьирует в достаточно широком диапазоне – от состояния двигательного возбуждения, так называемого состояния пароксизмального бега, до более тяжелых тонических и клонических судорог. При этом, пароксизмальный бег, как правило, состоит из двух периодов, разделенных «тормозной паузой». Наиболее редким вариантом реакции животных являются генерализованные конвульсии.

Для аудиогенной стимуляции нами была сконструирована специальная система, в основу которой была положена схема аналогичной системы, выпускающейся компанией Stoelting (США). Система представляет собой прозрачную пластиковую камеру размером 25 x 25 x 25 см, помещенную в звуконепроницаемый короб. Камера снабжена звонком высокой силы звука и видеокамерой Digital USB 2.0 CMOS Camera производства Stoelting (США).

Для экспериментов использовали мышей поколения G3 с ENU-индуцированным эпилептогенезом на 40-50 сутки после рождения. Животное помещали в экспериментальную камеру и через 1 минуту периода адаптации подавали дробный звуковой сигнал – 4 эпизода по 20 секунд с 2-х секундными перерывами. Подачу звукового сигнала останавливали либо в случае достижения общего времени 80 секунд, либо при возникновении судорожной активности.

Для оценки интенсивности реакции животных на звуковую стимуляцию применяли следующие параметры: интенсивность неврологической реакции в баллах (0-4), латентный период появления двигательного возбуждения (в

секундах), латентный период появления судорог (в секундах), характер конвульсивного ответа (одно- или двухволновой).

Тяжесть судорожного синдрома оценивали по шкале Крушинского [123]:

0 баллов – отсутствует какая-либо поведенческая или моторная реакция на звуковую стимуляцию;

1 балл – двигательное возбуждение в виде пароксизмального бега, содержащего одну или две фазы (уни- или бифазический бег);

2 балла – клонические судороги, характеризующиеся выгибанием спины, передних и задних лап, шеи. Как правило, сочетаются с мышечно-спастической реакцией;

3 балла – тонические судороги, характеризующиеся вытягиванием животного с явлениями ригидности поперечно-полосатых мышц;

4 балла – генерализованный тонико-клонический пароксизм, зачастую может заканчиваться гибелью животных.

В постконвульсивном периоде может наблюдаться фаза нечувствительности и неподвижности.

В течение 7 суток перед проведение эксперимента все животные опытных и контрольной групп получали внутрижелудочно референтное противоэпилептическое лекарственное вещество карбамазепин в виде субстанции или исследуемые соединения в виде субстанций ЛХТ-317 и ЛХТ-318 в крахмальном клейстере. В день эксперимента внутрижелудочное введение исследуемых фармакологических агентов прекращали.

2.6 Модель пилокарпинового эпилептогенеза

В качестве базовой модели эпилептогенеза использовали пилокарпиновую экспериментальную модель. Ее достоинствами является простота воспроизведения, возможность оценки противосудорожного и противоэпилептогенного действия потенциальных лекарственных средств.

Эту модель мы также применяли для проведения морфологического и молекулярного разделов исследования [124].

Модель воспроизводили в соответствии с известными литературными описаниями [125] следующим образом: половозрелым крысам с нанесенными на них цветовыми метками на холку и хвост линии Wistar обоего пола весом 180-250 г внутрибрюшинно вводили скополамина метилбромид (Scopolamine methyl bromide, субстанция чистотой более 98% производства Merck Sigma-Aldrich, Германия) в дозе 1 мг/кг для профилактики периферических эффектов пилокарпина. Через 30 мин указанным животным также внутрибрюшинно вводили пилокарпина гидрохлорид (Pilocarpine hydrochloride, субстанция чистотой более 98% производства Merck Sigma-Aldrich, Германия) в дозе 320 мг/кг.

После введения у животных формировался генерализованный судорожный синдром продолжительностью от 90 до 150 мин в виде лимбических моторных судорог с интенсивной гиперсаливацией, вокализацией, клонусом конечностей, постуральными нарушениями. Для купирования судорожного синдрома (в случае необходимости) или его ослабления через 90 мин животным внутрибрюшинно вводили раствор диазепама в дозе 2 мг/кг.

В течение последующих 4 недель животные переводились на обычный режим содержания. Начиная с 5-й недели проводили видеорегистрацию двигательной активности экспериментальных животных, находящихся в клетках из прозрачного пластика по 3 животных в каждой, 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 ЛД₅₀, определенного при данном пути введения у крыс.

Исходно (за 1 сутки до начала введения соединения ЛХТ-318 и препарата сравнения), а также на 7 и 56 сутки экспериментального эпилептогенеза у всех животных в группах регистрировали поведенческие реакции.

Через 8 недель после воспроизведения экспериментальной модели животные выводились из эксперимента под эфирным наркозом, у крыс извлекали головной мозг, фрагменты которого в дальнейшем были использованы для проведения морфологического и молекулярного исследования.

2.7 Методы оценки поведенческих реакций крыс на модели экспериментального пилокарпинового эпилептогенеза

Для оценки поведенческих реакций применяли два теста: приподнятый крестообразный лабиринт и открытое поле. Эксперименты выполнялись на установках производства ООО НПК «Открытая наука» (Санкт-Петербург, Россия), снабженных цифровыми камерами видеорегистрации.

2.7.1 Метод изучения уровня тревожности в тесте приподнятый крестообразный лабиринт

Установка состояла из двух расположенных друг напротив друга открытых рукавов 50 x 10 см, изготовленных из непрозрачного пластика светло-серого цвета и двух расположенных друг напротив друга закрытых рукавов 50 x 10 x 40 см, изготовленных из непрозрачного пластика светло-

серого цвета. Рукава располагаются перпендикулярно на возвышении 50 см от пола, в области перекреста помещается центральная платформа размером 10 x 10 см (рисунок 4).



Рисунок 4 – Установка «крестообразный лабиринт» ООО НПК «Открытая наука», использованная в эксперименте для изучения уровня тревожности

В соответствии с протоколом эксперимента каждое животное помещается на центральную платформу и ориентируется так, что морда обращена к открытому рукаву установки. Для каждой лабораторной крысы видеорегистрацию двигательной активности в обоих рукавах проводили в течение 5 мин. Заход в рукав определялся как нахождение всех четырех лап в соответствующем рукаве. При такой постановке опыта подсчитывали общее количество входов, процент входов и время, проведенное в каждом из рукавов по отношению к общему времени нахождения в лабиринте [126]. Для обработки лабиринта после каждого животного использовали 20% раствор этилового спирта.

Подсчет результатов производился в специально разработанной программной среде, которая на основе анализа цифровых изображений с камер видеорегистрации автоматически вычисляла время нахождения

животных в рукавах и рассчитывала так называемый индекс тревожности (ИТ), который представлял собой отношение (в процентах) времени, проведенного животным в открытой части лабиринта к общему времени, проведенному крысой в обоих рукавах лабиринта за вычетом времени, проведенного на центральной платформе.

Лабораторные животные со значением ИТ меньшим либо равным 20% были классифицированы как тревожные, крысы с большим значением индекса рассматривались как животные с низким уровнем тревожности (нетревожные) [127-131].

2.7.2 Метод изучения поведенческих реакций животных с пилокарпиновым эпилептогенезом в тесте открытое поле

Для проведения экспериментов применяли открытую пластиковую арену белого цвета (рисунок 5) диаметром 150 см, закрытую глухими стенками по периметру и разделенную черными линиями на 19 секторов. Каждое животное помещалось в центр арены на 5 мин. Подсчитывали число пересеченных секторов (всеми четырьмя лапами), время, проведенное в каждом секторе (в центре или на периферии), число заглядываний в норки (отверстия в полу арены), общее число вставаний на нижние конечности, замираний, груминга [132].



Рисунок 5 – Установка «открытое поле» ООО НПК «Открытая наука», использованная в эксперименте для изучения поведения животных

Для обработки лабиринта после каждого животного использовали 20% раствор этилового спирта.

2.8 Методы морфологического и молекулярного исследования

На 57 сутки всех животных контрольной, интактной групп, групп препарата сравнения и исследуемого вещества ЛХТ-318 выводили из эксперимента под эфирным наркозом и подвергали транскардиальной перфузии 25 мл 0,12 М буфера Миллонига (Merck Sigma-Aldrich, Швейцария) с последующей перфузией 50 мл 0,1% сульфида натрия и 100 мл 3% глутарового альдегида, после чего головной мозг извлекали, препарировали под стереомикроскопом, выделяли гипоталамус, область зубчатой борозды, делили выделенные фрагменты на 2 фрагмента – 1/3 для морфологических исследований и 2/3 объема – постфиксировали при 4⁰С и подвергали криопротекции в течение 48 часов в 30% растворе сукозы. Для проведения молекулярных исследований замораживали в морозильной камере производства компании Sanyo (Корея).

2.8.1 Морфологические методы исследования

С помощью криотома изготавливали срезы головного мозга в корональной проекции толщиной 30 мкм и сохраняли их в анти-размораживающем растворе до проведения окрашивания.

Окрашивание крезил-виолетом (по Нислю). Нейрональное повреждение в гиппокампе и зубчатой борозде определяли при окрашивании корональных срезов головного мозга по Нислю с применением 0,4% крезил-виолета. Идентифицируемые ядра нейронов гиппокампа подсчитывали в трех последовательных срезах в центральных областях дорзального гиппокампа в обоих полушариях головного мозга, соответствующих области 30 атласа головного мозга крысы [133] при увеличении x400 на цифровом микроскопе

Olympus Vx50 (Япония) на площади 1000 мкм². Результаты представляли как число клеток/мм².

Окрашивание нео-Timm проводили для выявления мшистых волокон в зубчатой борозде головного мозга животных по [134]. Срезы головного мозга помещали в 360 мл раствора, содержащего 240 мл гуммиарабика, 10,25 г лимонной кислоты, 9,45 г цитрата натрия, 3,73 г гидрохинона и 510 мг нитрата серебра на 45 мин при температуре 21⁰С. Для контроля процесса окрашивания проводили визуальную оценку срезов. Для предотвращения погрешностей срезы интактных, контрольных и опытных животных окрашивали в одном и том же растворе красителя.

Анализ оптической плотности проводили в специальной программной среде, позволяющей определять интенсивность разветвления мшистых волокон. Для этого проводили анализ изображений под микроскопом Olympus Vx50 (Япония), снабженным цифровой видеокамерой Sony CCD-Iris (Япония). Программа оценивала попиксельно интенсивность серого оттенка в изображении в диапазоне от 1 (белый) до 256 (черный). Анализу подвергались области зубчатой борозды в соответствии с атласом строения головного мозга крыс.

2.8.2 Метод определения тканевой концентрации ИЛ-1бета и ФНО-альфа в ткани головного мозга крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом

Для определения тканевой концентрации провоспалительных цитокинов в области интереса – гипоталамусе и зубчатой борозде головного мозга крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом на 57 сутки эксперимента использовали метод количественного иммуноферментного анализа (ИФА) типа «сэндвич».

После трехкратного размораживания и замораживания криоконсервированных образцов головного мозга животных, необходимых

для разрушения клеточных мембран, гомогенизировали биологические ткани, центрифугировали при 5000 об./мин, надосадочную жидкость собирали и использовали в определении. Для этого раскапывали продукт гомогенизации в планшеты экспертного диагностикума с нанесенными анти-ИЛ-1 бета и анти-ФНО-альфа крысиными антителами производства компании «CUSABIO BIOTECH Inc.» (Китай).

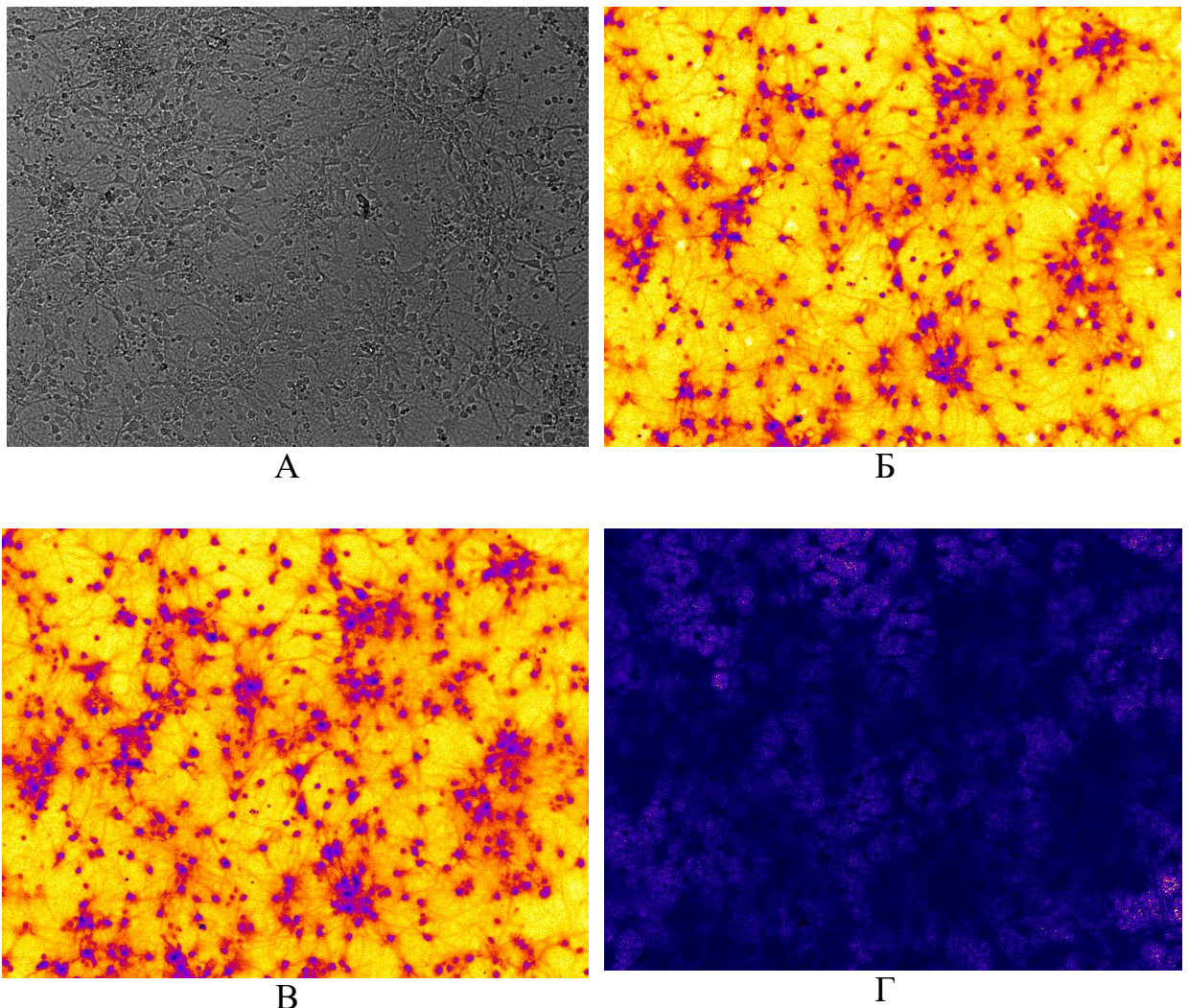
Регистрацию результатов реакции проводили на полуавтоматическом ридере StatFAX-4200 (США). Результаты получали в пг/мл.

2.9 Методы исследования ЛХТ-318 в смешанной кортикальной культуре мышей с мутагенным эпилептогенезом

Клеточная культура готовилась в соответствии с описанием Gaidin et al. (2020) [135]. Для ее приготовления использовался головной мозг новорожденных мышей потомства G3 1-3 дней с эпилептогенным мутагенезом. Извлеченный головной мозг размельчали острым способом с помощью микрохирургических ножниц и затем инкубировали в растворе Версена, содержащем 0,2% раствор трипсина, в течение 10 мин при температуре 37⁰С и 600 оборотах в минуту в термоциклере.

После трехкратного промывания тканей в нейробазальной среде (Gibco, США) трипсинизированной ткани аккуратно растирались пипеткой и затем осаждались в течение 2 мин при 1000 оборотах в мин. Аккуратно убирали супернатант, содержащий неклеточные элементы. Затем клетки ресуспендировались в нейробазальной среде с добавлением 0,5 мМ глутамина, 2% суплемента B27 и 15 мг/мл гентамицина. Клетки рассеивались на покрытые полиэтилемином 25 нм стеклянные покровные стекла (производства VWR International, США) и переносились в чашки Петри (производства Grainer, США). Эксперименты выполняли на 9 день *in vitro* (рисунок 6).

Флуоресцентная микроскопия. 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) [135, 136]. Первичные нейроглиальные клетки окрашивались зондом Fura-2 AM, растворенным в растворе Хэнкса в финальной концентрации 4 мкМ, содержащем в мМ следующие вещества: хлорид натрия – 156, хлорид калия – 3, сульфат магния – 1, гидрофосфат калия – 4, хлорид кальция – 2, глюкозу – 10, HEPES – 10, pH – 7,4.



Примечания: А – проходящий свет; Б – окраска эфиром Fura-2 AM при длине волны 340 нм; В – окраска эфиром Fura-2 AM при длине волны 380 нм (глиальные клетки флуоресцируют ярче). Г – деление двух каналов (340 нм / 380 нм)

Рисунок 6 – Смешанная кортикальная первичная культура мыши СЗН с эпилептогенным эпилептогенезом (9 суток). Микрофото, x10

Покровные стекла с клетками инкубировали с 200 мкл свежеприготовленного красителя в течение 40 мин при температуре 37⁰С и затем дважды промывали раствором Хэнкса.

Для регистрации внутриклеточных изменений концентрации цитоплазматического ионизированного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) использовали систему Cell Observer image analysis system (производства Carl Zeiss, Германия) на базе инвертерного микроскопа Axiovert 200M, снабженного монохромной AxioCam HSm CCD камерой с системой высокоскоростной фильтрации возбуждений Ludl MAC5000, с объективом Plan-Neofluar 10×/0.3 (рисунок 7).

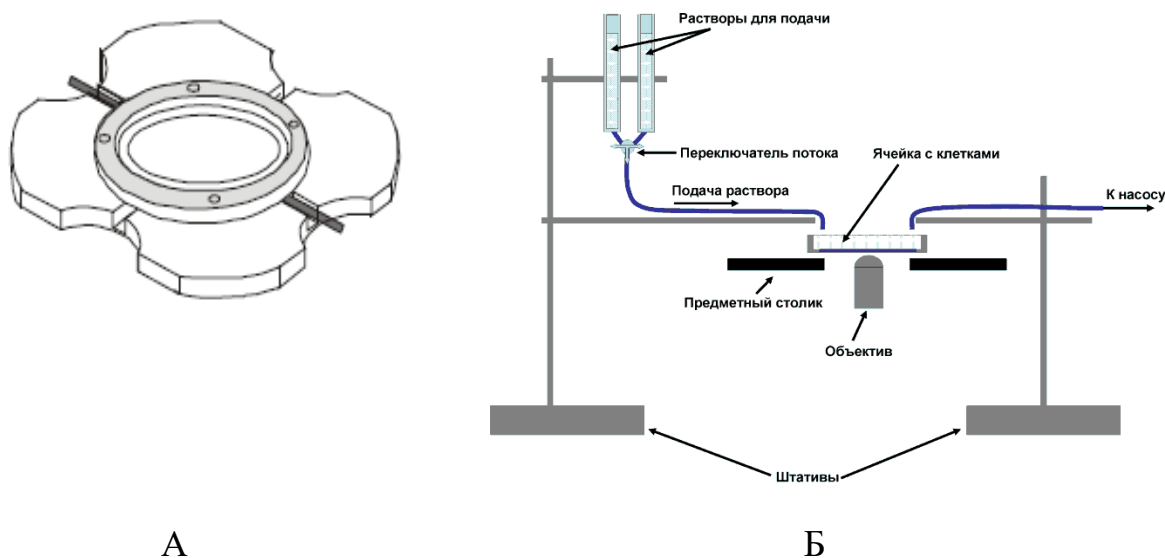


Рисунок 7 – Специальная система для регистрации флуоресценции на базе Cell Observer image analysis system: А – открытая проточная камера для определения флуоресценции живых клеток; Б – перфузионная установка (пояснение в тексте)

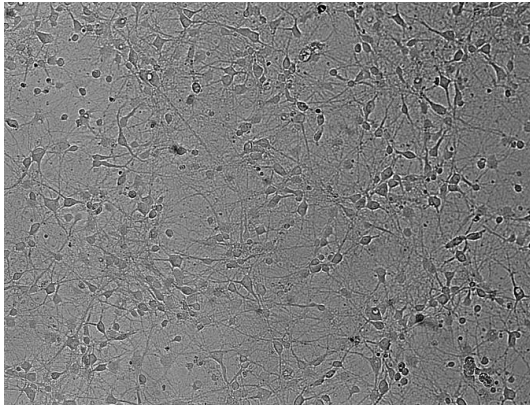
Создание эпилептогенных условий. Для индукции флуоресценции использовали ультрафиолетовую ртутную лампу НВО 103W/2. Для индукции и регистрации флуоресценции применяли набор из 21 фильтра (производства Carl Zeiss, Германия) с фильтрами возбуждения ВР340/30 и ВР387/15. Круглое покровное стекло помещали в специальную камеру, содержащую 0,5 мл культуральной среды, для оценки флуоресценции. После регистрации спонтанного возбуждения нейронов создавали эпилептиформное состояние

путем удаления из среды магния в соответствии с описанием Turovskaya et al. (2020) [136].

Измерения проводили при температуре 28⁰С с частотой записи 1 кадр в 3 сек. Для анализа двухканальных изображений длиной волны возбуждения 340 и 380 нм использовали программную среду ImageJ (США). Статистический анализ проводили с использованием программы Origin 8.5 (США).

Иммуноцитохимическое исследование. Для определения внутриклеточной концентрации кальций- связывающего белка парвальбумина применяли метод окрашивания клеток нейроглиальной гипоталамической культуры со специфическими анти-PV антителами, для чего клетки фиксировались в 4% забуференном формалине и изотоническом 0,9% растворе хлористого натрия в течение 10 мин. После трехкратного промывания проводили окрашивание живых клеточных препаратов вторичными антителами, содержащими флуоресцентную метку, в темноте. Дальнейшее определение флуоресценции проводили в соответствии с описанием, представленном выше.

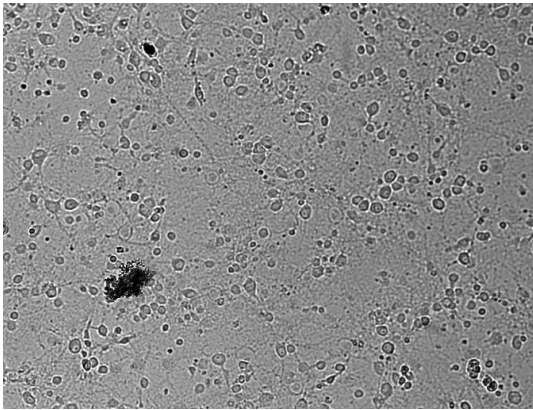
Метод определения выживаемости клеток. Количество живых и погибших нервных клеток устанавливали при помощи специального метода окрашивания – красителем иодидом пропидия (PI), используемым в концентрации 1 мкг/мл. Этот краситель проникает лишь только в погибшие клетки и флуоресцирует красным светом. При этом неизменным условием проникновения является нарушение целостности цитоплазматической мембраны. Регистрацию флуоресцентной реакции PI проводили с использованием наборов светофильтров «FilterSet 49» производства «Carl Zeiss» (Германия). Клетки окрашивались пропидия иодидом до формирования эпилептоподобной реакции (рисунок 7 А, Б) и после создания эпилептогенных условий (ЭУ) (рисунок 8 В, Г).



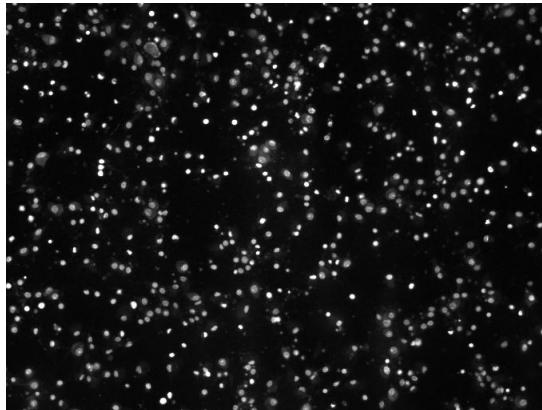
А. До ЭУ. Проходящий свет



Б. До ЭУ Иодид пропидия



В. После ЭУ



Г. После ЭУ Иодид пропидия

Рисунок 8 – Клетки коры головного мозга мышей после окрашивания иодидом пропидия. Пояснения в тексте

2.10 Методы статистического анализа результатов

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,

поскольку во всех группах число животных не превышало 10 особей. Применяли пакет статистических программ BioStat (Россия) и SPSS (США).

ГЛАВА 3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРА – АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ 2-АМИНОЭТАНСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЫ СКРИНИНГ ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ

Одним из наиболее важных вопросов фармакологии является выбор корректных подходов для проведения первичного фармакологического скрининга. При этом, в его основу должен быть положен как отбор наиболее перспективных молекул, обладающих потенциальной активностью, безопасностью и приемлемым фармацевтическим профилем (растворимость, возможность создания удобной с точки зрения конкретной клинической ситуации лекарственной формы и прочее), так и скрининговые биологические модели, по возможности наиболее близко воспроизводящие реальную патологию или состояние, для лечения которого будет применяться потенциальное лекарственное средство.

В нашем случае мы для ответа на поставленные вопросы использовали два методических подхода: количественный анализ структура – активность и скрининговую модель эпилептогенного мутагенеза с воспроизведением судорожного синдрома звуковой стимуляцией высокой силы звука.

3.1 Количественный анализ структура – активность магниевого и цинкового соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты

С использованием программы PASS провели количественный анализ структура – активность магниевого – магния бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-317) – и цинкового – цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318) – соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты. В таблице 2 суммированы результаты выполненного количественного анализа в виде вероятности воспроизведения стимулирующего (P_a) или подавляющего (P_i) биологического эффекта.

Таблица 2 – Количественная характеристика вероятности активирующего и ингибирующего действия соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты в отношении потенциальных мишеней

Шифр вещества	Химическое название	Pa	Pi	Вид действия и мишень
1	2	3	4	5
ЛХТ-317	магния бис-ацетамино- 2-амино- этансульфоат	0,837	0,004	Ингибитор протеасомной АТФазы
		0,836	0,006	Ингибитор NMDA-рецептор
		0,826	0,001	Ингибитор эндогликозилцерамидазы
		0,799	0,002	Ингибитор билирубин оксидазы
		0,800	0,004	Судорожной активности ингибитор
		0,801	0,009	Ингибитор глутатионредуктазы
		0,798	0,006	С1-АТФазы ингибитор
		0,786	0,009	Фрагилизина ингибитор
		0,790	0,014	Лечение мукозитов

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
ЛХТ-317	магния бис-ацетамино- 2-амино- этансульфоат	0,779	0,012	Ингибитор лизазы
		0,768	0,004	Скавенджер кислорода
		0,768	0,005	Метилумбеллиферин ацетат деацетилазы ингибитор
		0,757	0,007	Радиопротектор
		0,757	0,010	Ингибитор лизазы фукостерола-эпоксида
		0,768	0,028	Протектор тучных клеток
		0,724	0,004	Цитопротектор
		0,719	0,004	Аланин-тРНК лигазы ингибитор
		0,718	0,009	Ингибитор формальдегид транскетолазы
		0,741	0,034	Ингибитор сахаропепсина
		0,741	0,034	Ингибитор химозина

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		0,741	0,034	Ингибитор акроцелиндропепсина
ЛХТ-317	магния бис-ацетамино- 2-амино- этансульфоат	0,704	0,002	Ингибитор трансферазы желчных кислот
		0,706	0,004	Ингибитор галакто-О- липазы
		0,704	0,004	Ингибитор длинноцепочечной N- ацилэтаноламин деацетилазы
		0,711	0,011	Ингибитор полиамин- транспортной АТФазы
		0,702	0,003	Ингибитор сульфотрансферазы коэнзима В

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		0,702	0,003	Ингибитор этаноламинэстеразы
		0,724	0,027	Ингибитор бензоат- коэнзимА-лигазы
ЛХТ-317	магния бис-ацетамино- 2-амино- этансульфоат	0,709	0,012	Ингибитор N- ацетилнейраминтрансферазы
		0,697	0,005	Ингибитор сульфурредуктазы
		0,701	0,009	Ингибитор водородной дегидрогеназы
		0,715	0,024	Ингибитор ацилкарнитин гидролазы
		0,700	0,012	Ингибитор глицерил монноксигеназы
		0,700	0,012	Ингибитор декарбоксилазы фосфатидилсерина

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		0,744	0,056	Терапия тревожных расстройств
		0,703	0,020	Глицерофосфатазы ингибитор
		0,689	0,007	Стимулятор лейкопоэза
ЛХТ-317	магния бис-ацетамино- 2-амино- этансульфоат	0,691	0,010	Ингибитор актиназы
		0,680	0,005	Желтковой рибонуклеазы ингибитор
		0,679	0,005	Ацилацетилпептидазы ингибитор
		0,682	0,010	Гистидинацетилтрансферазы ингибитор
		0,678	0,006	Тиоловой оксидазы ингибитор
		0,687	0,022	Псевдолизина ингибитор

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		0,665	0,004	N-Галактооксидазы ингибитор
		0,678	0,018	Пептидилдипептидазы ингибитор
		0,657	0,004	Диамин-ацетилтрансферазы ингибитор
ЛХТ-317	магния бис-ацетамино- 2-амино- этансульфоноат	0,669	0,019	Лизин-аминомутаза ингибитор
		0,653	0,006	Дегалогеназы ингибитор
		0,654	0,008	Кетолазы ингибитор
		0,658	0,019	Стимулятор электронтранспортирующей дегидрогеназы
		0,696	0,065	Ингибитор диметилаллилтрансферазы

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		0,649	0,018	Глюкаинэндоглюкозидазы ингибитор
		0,631	0,003	Фенилаланинрацемазы ингибитор
		0,648	0,021	Диметиларгиназы ингибитор
		0,877	0,001	Судорожной активности ингибитор
ЛХТ-318	цинка цикло-бис- ацетамино-2- аминоэтан- сульфоноата	0,761	0,045	Противовоспалительная активность
		0,702	0,010	Хлоридпероксидазы ингибитор
		0,650	0,019	Тиоредоксина ингибитор
		0,605	0,010	Гидроксициннамоил трансферазы ингибитор
		0,659	0,069	Тестостерон-бета- дегидрогеназы ингибитор

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		0,611	0,041	Ацилкарнитин гидролазы ингибитор
		0,619	0,062	Антагонист никотиновых alpha3beta4alpha5 рецепторов
		0,568	0,025	Стимулятор лейкопоэза
		0,597	0,055	Глутамилэндопептидазы ингибитор
ЛХТ-318	цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтан-сульфоноата	0,571	0,037	Веномбина АВ ингибитор
		0,631	0,108	Терапия тревожных расстройств
		0,553	0,031	С1-АТФазы транспортной ингибитор
		0,573	0,054	Активатор почечных функций

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		0,579	0,060	Фосфатазы сахаров ингибитор
		0,560	0,042	Алкилацетил- глицерофосфатазы ингибитор
		0,533	0,022	Глиоксилатредуктазы ингибитор
		0,547	0,039	Фосфатидилхолин-О- ретинол трансферазы ингибитор
ЛХТ-318	цинка цикло-бис- ацетамино-2- аминоэтан- сульфоноата	0,535	0,027	IgA-специфический сериновой эндопептидазы ингибитор
		0,558	0,054	НАДФН-пероксидазы ингибитор

Продолжение Таблицы 2

1	2	3	4	5
		0,601	0,100	Цитопротектор тучных клеток
		0,573	0,073	Гликозилинозитол фосфалипазы ингибитор
		0,539	0,042	Лизин 2,3-аминомутаза ингибитор
		0,574	0,078	Полипоропепсина ингибитор
		0,574	0,083	Акроцилиндро-эндопепсина ингибитор
		0,574	0,083	Сахаропепсина ингибитор
		0,574	0,083	Химозина ингибитор
		0,546	0,061	Омптина ингибитор

Продолжение Таблицы 2

ЛХТ-318	цинка цикло-бис- ацетамино-2- аминоэтан- сульфоноата	0,524	0,043	Скавенджер кислорода
		0,502	0,030	Трансретинил-пальмитат- гидролаз ингибитор
		0,482	0,014	Лечение болезни Альцгеймера
		0,526	0,061	Ингибитор компонента D комплемента
		0,560	0,095	Ноотроп
		0,479	0,021	2-кетокеслот дегидрогеназ ингибитор
		0,495	0,047	Ингибитор ферулоилэстераз
		0,558	0,112	Ингибитор мембранной проницаемости
		0,493	0,050	Ингибитор птериндеаминазы
		0,489	0,047	Аминобутиральдегид- дегидрогеназы ингибитор

При проведении количественного анализа структура – активность магния бис-ацетамино-2-амино-этансульфоноат (соединение ЛХТ-317) было установлено, что с вероятностью, превышающей 60% у соединения 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.

В частности, ингибиторная активность прогнозируется в отношении: глутатионредуктазы, С1-АТФазы, лиазы фукостерола-эпоксида, длинноцепочечной N-ацилэтаноламин деацетилазы, N-ацетил-нейраминтрансферазы, декарбоксилазы фосфатидилсерина. Помимо этого, соединение ЛХТ-317 прогнозируется как стимулятор электрон-транспортирующей дегидрогеназы.

У цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты установлена ингибиторная активность в отношении следующих биологических мишеней, по данным литературы задействованных в эпилептогенезе: тиоредоксина ингибитор, антагонист никотиновых альфабета3бета4альфа5 рецепторов, С1-АТФазы транспортной ингибитор, алкилацетил-глицерофосфатазы ингибитор, фосфатидилхолинретинол трансферазы ингибитор, НАДФН-пероксидазы ингибитор, гликозилинозитол фосфалипазы.

По данным количественного прогноза соединения цинка может применяться для лечение 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 обосновывает целесообразность проведения дальнейшего фармакологического поиска.

3.2 Скрининг противосудорожной активности ЛХТ-317 и ЛХТ-318 на модели мутагенного эпилептогенеза у мышей с аудиогенными судорогами

В соответствии с описанной методикой эксперимента 40-дневных мышей поколения G3 с ENU-индуцированным эпилептогенезом тестировали в камере, позволяющей воспроизводить аудиогенные судороги. За 7 суток до эксперимента интактным мышам C57Bl6 вводили ежедневно в 11.00 2% крахмальный клейстер внутрижелудочно, мышам из мутагенного помета, включенным в группу сравнения также вводили 2% крахмальный клейстер.

В контрольной группе животные получали карбамазепин в виде чистой субстанции в дозе 10 мг/кг, что соответствовало 5% от показателя ЛД₅₀, определенному на модели литиево-илокарпиновой эпилепсии у мышей по данным [137]. Исследуемые соединения вводили животным также внутрь в дозах 110 мг/кг, что соответствовало 5% от показателя ЛД₅₀, определенному при внутрижелудочном введении у мышей по данным д.м.н. Е.В. Семелевой (2021) [18].

Протокол эксперимента предусматривал фиксацию у каждого животного в серии латентного времени формирования психомоторного возбуждения (моно- или бифазический бег), латентного времени появления судорожного синдрома, продолжительности конвульсивного эпизода. Вычисленные результаты представлены для всех экспериментальных групп в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние внутрижелудочного введения ЛХТ-317 и ЛХТ-318 на продолжительность судорожного синдрома и латентный период у мышей с EDU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом на модели аудиогенных судорог (n=6 в каждой группе животных)

Исследуемое соединение	Доза, мг/кг в сутки	Время, с		
		до ПМВ	до начала судорог	длительности судорог
Интактные	-	38±4	0±0	0±0
Контроль	-	17±2	44±3	286±14
Карбамазепин	10,0	29±3*	61±4*	172±8*
ЛХТ-317	110,0	17±2	51±5	268±10
ЛХТ-318	110,0	24±4	58±3*	196±12*

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

У интактных мышей C57Bl6 аудиогенная стимуляция приводила к формированию психомоторного возбуждения в среднем через 38±4 с после подачи звукового сигнала. При этом ни у одной мыши не наблюдали возникновения судорожного синдрома. После прекращения стимуляции самопроизвольно возбуждение сменялось фазой релаксации.

В контрольной группе животных фиксировали существенное сокращение латентного времени формирования психомоторного возбуждения – до 17±2, что было почти в два раза меньше, чем у интактных грызунов. Через 44±3 с после подачи звукового сигнала у всех мышей развивался судорожный синдром различной интенсивности, продолжавшийся в среднем 28±4 с. Судороги купировались самостоятельно у всех животных в группе. У 1 мыши констатировали летальный исход.

Препарат сравнения карбамазепин, вводимый мышам с EDU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом в суточной дозе 10 мг/кг в течение 7 суток, статистически значимо увеличивал латентные периоды: возникновения психомоторного возбуждения – до 29±3 с и судорожного

синдрома – до 61 ± 4 с. Также референтный противосудорожный препарат значительно сокращал продолжительность конвульсивного эпизода по сравнению с контролем до 17 ± 3 с.

Важным аспектом в оценке противосудорожного потенциала было определение частоты формирования судорожного синдрома и его тяжести по четырехбалльной шкале Крушинского [123]. Результаты наблюдений представлены на рисунке 9 и таблице 4.

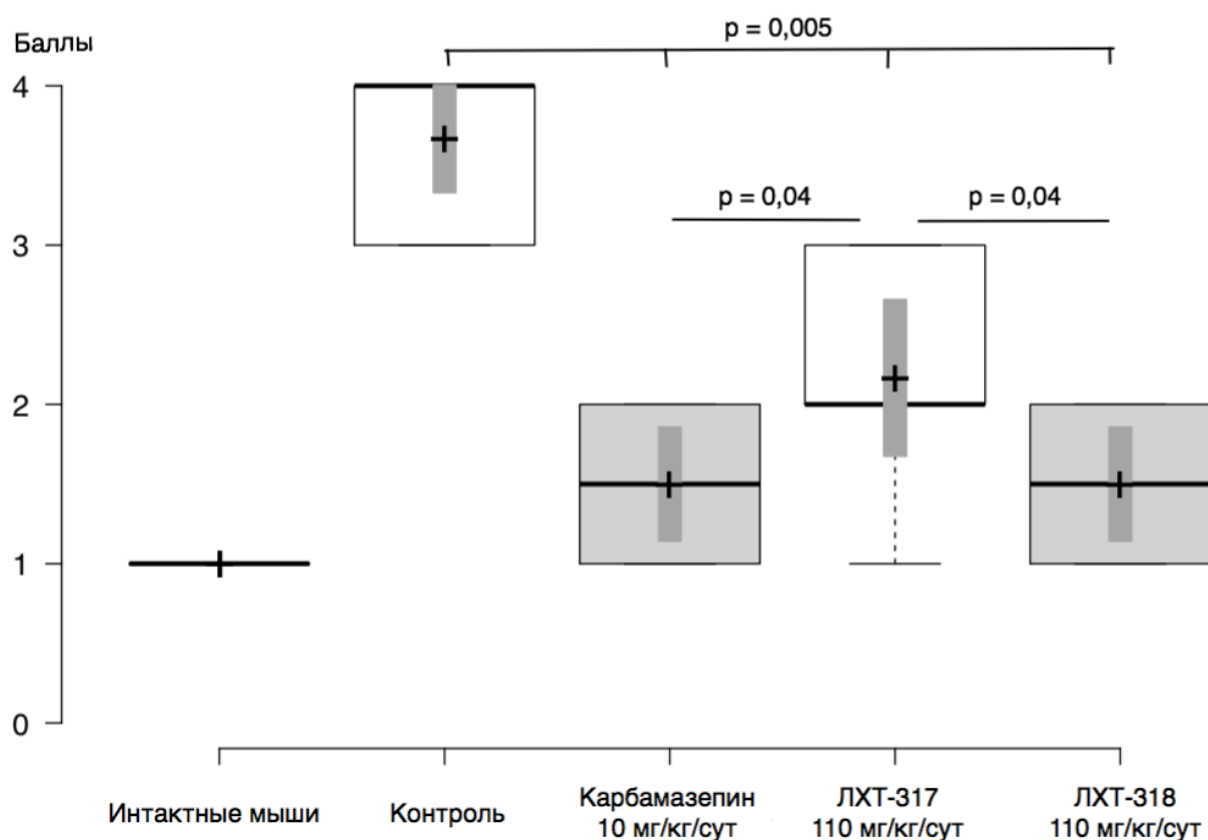


Рисунок 9 – Тяжесть судорожного синдрома у животных с EDU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом на модели аудиогенных судорог (n=6 в каждой группе животных): одномерный дисперсионный анализ, критерий Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm MSE$

У животных интактной группы судорожный синдром не формировался. В контроле у всех мышей наблюдали развитие судорожного синдрома по типу тонических, клонических или больших тонико-клонических эпизодов. 2 мыши (33,3%) погибли в результате генерализации судорожного синдрома.

Таблица 4 – Влияние внутрижелудочного введения ЛХТ-317 и ЛХТ-318 на частоту формирования судорожного синдрома и летальность мышей с EDU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом на модели аудиогенных судорог (n=6 в каждой группе животных)

Исследуемое соединение	Доза, мг/кг в сутки	Число животных	
		С судорогами (%)	Погибло (%)
Интактные	-	0 (0)	0 (0)
Контроль	-	6 (100)	2 (33,3)
Карбамазепин	10,0	4 (66,7)*	0 (0)*
ЛХТ-317	110,0	5 (83,3)	1 (16,7)
ЛХТ-318	110,0	4 (66,7)*	0 (0)*

Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении с контролем (точный критерий Фишера)

В группе животных, получавших в течение 7 суток препарат сравнения карбамазепин в суточной дозе 10 мг/кг, наблюдали снижение частоты возникновения судорожного синдрома до 66,7% ($p < 0,05$ при сравнении с контролем). Экспериментальной гибели не наблюдали.

Исследуемые вещества обладали разной силой эффекта на представленной модели. 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.

Следовательно, на основании результатов, полученных на скрининговом этапе исследования, в качестве соединения, обладающего наибольшим фармакологическим потенциалом для изучения в качестве

потенциального противосудорожного средства, мы выбрали цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318).

ГЛАВА 4. ПРОТИВОСУДОРОЖНОЕ И АНТИЭПИЛЕПТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИНКОВОЙ СОЛИ 2-АМИНОЭТАНСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ

На пилокарпиновой модели эпилептогенеза изучили противосудорожную и антиэпилептогенную активность цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318). 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 противозэпилептическим средством карбамазепином; оценили также влияние соединения на поведенческие реакции грызунов. 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.

4.1 Противосудорожное действие ЛХТ-318 на пилокарпиновой модели эпилептогенеза

Внутрибрюшинное введение пилокарпина гидрохлорида бодрствующим крысам в 100% наблюдений вызывало формирование лимбических генерализованных судорог с гиперсаливацией и вокализацией. У все животных в контрольной группе для купирования судорожного синдрома потребовалось вводить внутривенно (в вену хвоста) раствор диазепама в дозе 2 мг/кг (таблица 5).

Профилактическое в течение 7 суток внутрижелудочное введение карбамазепина в дозе 2,5 мг/кг, что соответствовало 2,5% показателя ЛД₅₀ при

соответствующем пути введения у мышей с учетом правил межвидового переноса дозы, сопровождалось снижением тяжести судорожного синдрома (рисунок 10) при сохранении частоты его формирования у животных (у всех крыс, включенных в группу, возникали судороги).

Таблица 5 – 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)

В группах животных, получавших экспериментальную противосудорожную терапию в течение 7 суток до введения индуктора эпилептогенеза, конвульсии в ответ на инъекцию пилокарпина формировались во всех наблюдениях, однако, длительность латентных периодов увеличивалась, продолжительность самого судорожного синдрома, как и его тяжесть были значительно ниже, чем в контрольной группе животных.

В частности, введение препарата сравнения сопровождалось увеличением латентного периода до возникновения судорог до 58 ± 3 с ($p < 0,05$ при сравнении с контролем), тогда как длительность генерализованных конвульсий не превышала 62 ± 11 мин. ($p < 0,05$ при сравнении с контролем) и не потребовала введения бензодиазепинового противосудорожного препарата диазепама для их купирования.

Внутрижелудочное курсовое введение соединения ЛХТ-318 в дозах 22,5 и 11,3 мг/кг/сут, пропорциональных 2,5 и 1,25% от среднетоксического показателя для мышей с учетом биологического переноса дозы, приводило к увеличению как латентного периода судорог, так и времени до появления признаков психомоторного возбуждения. В обеих дозах вещество сокращало длительность судорожного синдрома у всех животных в группе.

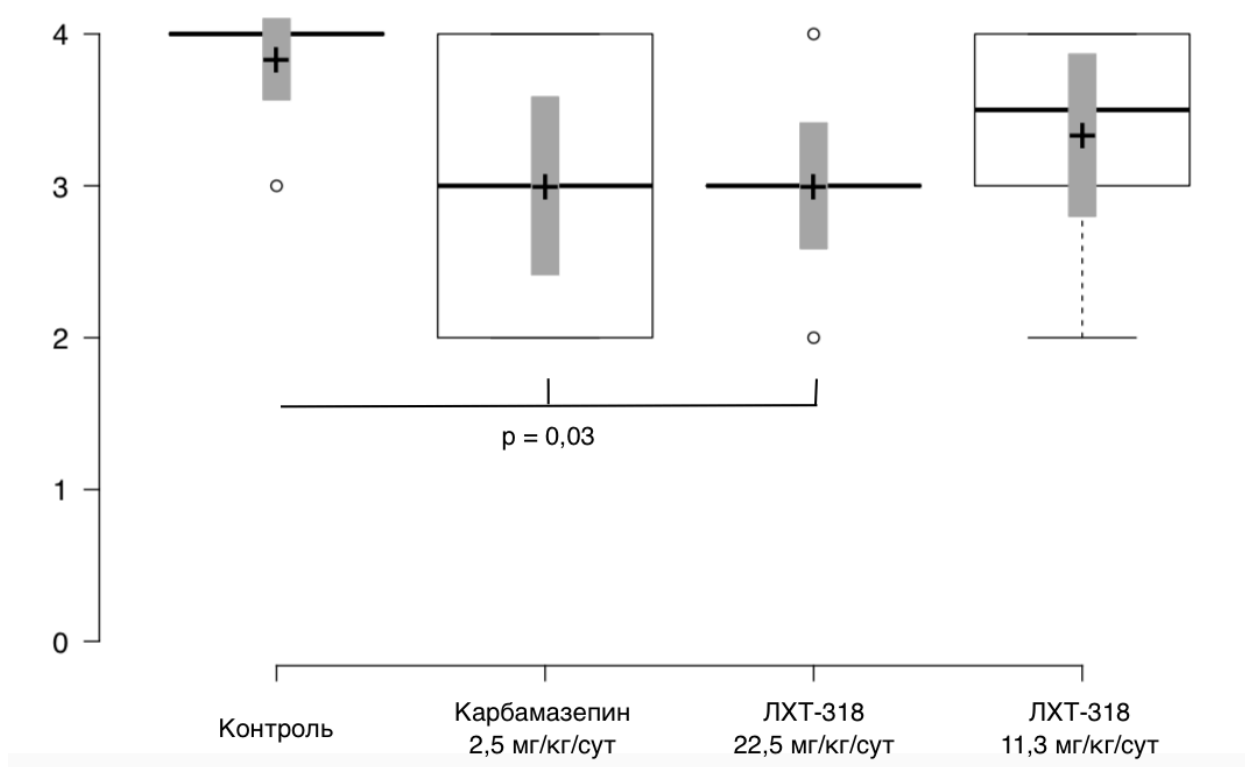
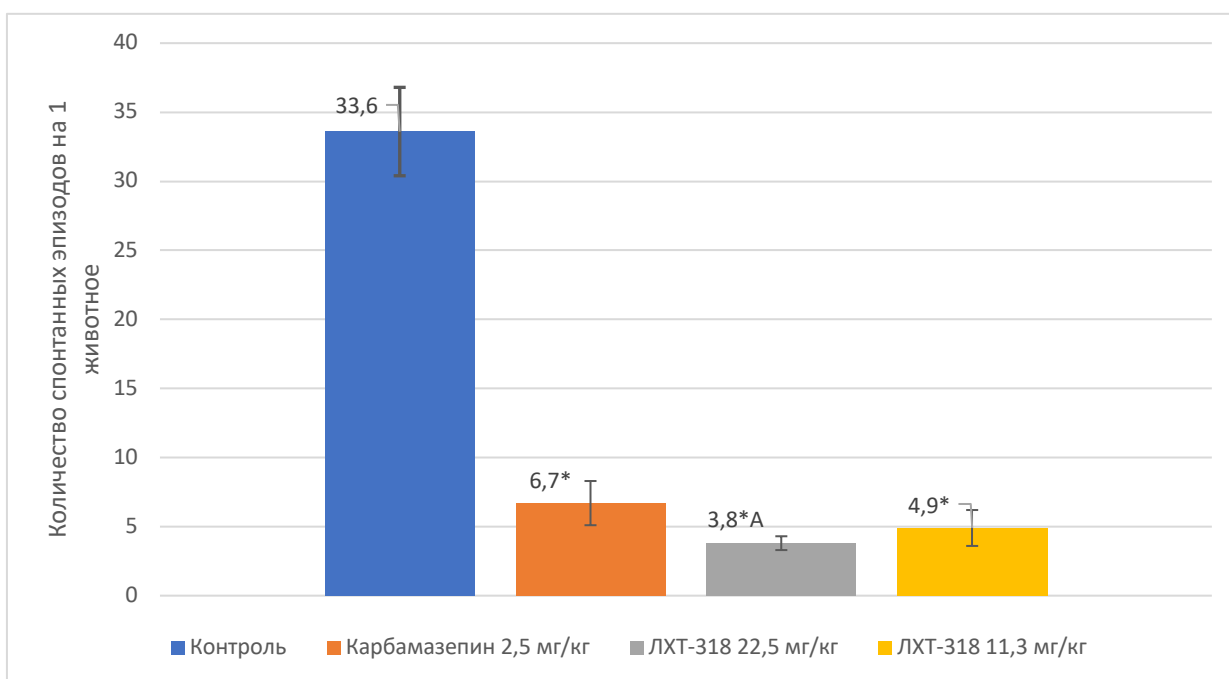


Рисунок 10 – Тяжесть судорожного синдрома у животных с острыми пилокарпиновыми судорогами (n=6 в каждой группе животных): одномерный дисперсионный анализ, критерий Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm MSE$

Как хорошо видно на рисунке 10 тяжесть судорожного синдрома на фоне внутрибрюшинного введения пилокарпина в экспериментальных группах варьировала. Тяжесть судорог в контроле не опускалась ниже 4 баллов, тогда как экспериментальная терапия как препаратом сравнения, так и исследуемым веществом в максимальной дозе позволила статистически значимо снизить тяжесть судорог: наблюдались преимущественно тонические или клонические судорожные пароксизмы.

Начиная с 29-ых по 56-е сутки после формирования модели экспериментальной 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 11).



Примечания: * $p < 0,05$ при сравнении с контролем; А $p < 0,05$ при сравнении с карбамазепином (критерии Колмогорова-Смирнова и Тьюки)

Рисунок 11 – Влияние экспериментальной курсовой терапии ЛХТ-318 на спонтанную судорожную активность крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом; данные представлены в виде $M \pm MSE$

Нами было установлено, что 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, что было пропорционально 2,5% от показателя ЛД₅₀, 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.

Таким образом, 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 активности сопоставимо с препаратом сравнения карбамазепином.

4.2 Влияние ЛХТ-318 на поведенческие реакции животных с пилокарпиновым эпилептогенезом

Изучили влияние цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318) 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 (таблица 6). Видеорегистрацию поведения проводили за сутки до введения пилокарпина гидрохлорида и через 56 суток после воспроизведения патологии.

Таблица 6 – Влияние ЛХТ-318 на уровень тревожности животных с пилокарпиновым эпилептогенезом 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* ^A	26,1±3,2	24,3±3,3 ^A
		ЧЗО,%	27,8±2,9	31,4±6,4 ^A	40,5±4,1	51,2±7,6 ^A
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); ^A p < 0,05 при сравнении с контролем (ANOVA, критерий Тьюки)

Исходно на основании анализа поведения животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» крысы каждой экспериментальной группы были разделены на тревожных, которые проводили в открытых рукавах лабиринта не более 20% времени, и нетревожных, у которых на время в открытых рукавах лабиринта приходилось более 20% общего времени регистрации поведения в установке.

В контрольной группе формирование пилокарпинового эпилептогенеза сопровождалось в группе тревожных животных сохранением исходного уровня тревожности при том, что двигательная активность (частота заходов в открытые рукава лабиринта) значительно снижалась по сравнению с исходными значениями. В подгруппе нетревожных крыс эпилептогенез сопровождался значительным ростом тревожности, что проявлялось резким снижением доли времени, проводимого в открытых рукавах лабиринта, настолько, что его значение было даже ниже, чем соответствующее значение в подгруппе тревожных животных.

Референтный препарат карбамазепин закономерно продемонстрировал противотревожную активность, описанную в литературе. Так, его курсовое введение позволило не только избежать повышения уровня тревожности, связанного с развитием патологии, но и снизить его в группе нетревожных животных по сравнению с исходными значениями.

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.

В тесте «открытое поле» оценили влияние ЛХТ-318 на двигательную и познавательную активность лабораторных животных (таблица 7). Видеорегистрацию поведения проводили за сутки до введения пилокарпина гидрохлорида и через 56 суток после воспроизведения патологии.

Таблица 7 – Влияние ЛХТ-318 на двигательную и познавательную активность животных с пилокарпиновым эпилептогенезом в тесте «открытое поле» (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
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	-	Пересечения	69,4±4,5	42±3,6*	71,8±5,1	33,4±6,9*
		Норки	27,4±3,6	17,8±2,6*	35,7±5,4	12,3±6,0*
		Стойки	12,7±2,4	9,6±1,8	15,4±2,9	7,5±3,2*
		Грумминг, с	18,9±2,5	21,3±1,7	9,3±1,5	17,4±2,6*
Карбамазепин	2,5	Пересечения	70,3±5,1	58,4±2,9 ^{A*}	72,4±4,7	55,8±4,1 ^{A*}
		Норки	25,2±2,1	19,4±3,8	31,6±4,3	23,4±3,9*
		Стойки	14,3±3,1	11,4±2,9	13,6±3,2	15,4±2,7*
		Грумминг, с	17,3±1,7	14,5±2,7 ^A	6,7±2,3	9,8±3,0 ^{A*}
ЛХТ-318	22,5	Пересечения	67,5±5,2	56,9±4,4	73,3±3,9	54,8±4,5 ^{A*}
		Норки	24,7±2,5	26,4±2,2 ^A	41,2±6,7	27,2±4,2 ^{A*}
		Стойки	10,6±3,1	11,4±2,7	17,3±3,3	15,8±2,4 ^{A*}
		Грумминг, с	16,5±2,1	22,8±1,9*	8,4±2,0	15,3±3,4*

Продолжение Таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7
ЛХТ-318	11,3	Пересечения	62,6±3,6	49,4±5,3	69,7±4,8	45,3±2,1 ^{А*}
		Норки	21,5±2,6	22,3±4,4 ^А	38,6±5,1	18,4±3,9*
		Стойки	8,4±4,2	8,5±3,2	15,2±4,6	16,1±3,2 ^{А*}
		Груминг, с	17,3±3,4	27,3±3,6*	6,9±4,0	16,7±4,8

Примечания: * $p < 0,05$ при сравнении с показателем до введения пилокарпина (парный t-тест); ^А $p < 0,05$ при сравнении с контролем (ANOVA, критерий Тьюки)

В контрольной группе животных формирование пилокарпинового эпилептогенеза сопровождалось вне зависимости от исходного уровня тревожности животных ее углублением. На этом фоне развивалась также существенная депрессия познавательной активности (снижение по сравнению с исходными значениями частоты заглядывания в норки и частоты стоек), двигательной активности (снижение по сравнению с исходными значениями числа пересечений секторов лабиринта). О повышении тревожности судили по росту времени груминга, который носил незавершенный характер с нарушением кранио-каудального градиента.

Референтный противосудорожный препарат в рамках экспериментальной терапии в дозе 2,5 мг/кг в сутки в течение 4 недель сдерживал формирование и углубление эпилептогенной тревожности, что наиболее ярко проявлялось в подгруппе нетревожных крыс. При этом, также отмечали протекторный эффект препарата в отношении когнитивной функции головного мозга животных, при этом отмечали слабое влияние профилактической терапии на двигательную функцию.

Исследуемое соединение цинка также обладало заметным влиянием на профиль поведенческих реакций экспериментальных грызунов с пилокарпиновым эпилептогенезом. 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 завершенный 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.

Таким образом, в структуре противозпилептогенного 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.

4.3 Влияние цинкового соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты на активность эпилептогенной нейровоспалительной реакции

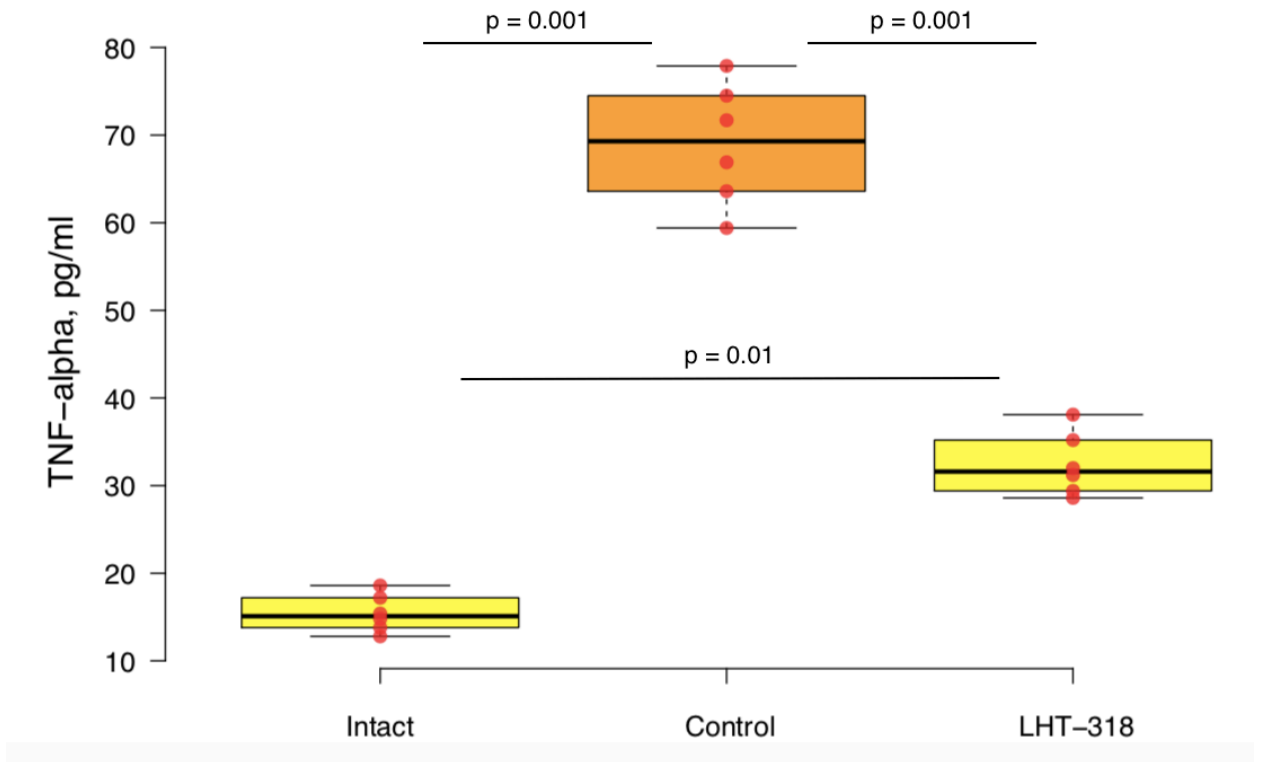
Для оценки активности воспалительной реакции в ответ на формирование пилокарпин-индуцированного эпилептогенеза определили концентрацию провоспалительных цитокинов ФНО-альфа и ИЛ-1бета, у которых по данным литературы доказана роль в формировании и поддержании нейровоспалительной реакции [138]. Для этого у выведенных на 57 сутки после введения пилокарпина крыс извлекали головной мозг, выделяли гиппокамп обоих полушарий органа и зубчатую борозду в строгом соответствии с атласом ГМ крыс и при помощи экспертных наборов диагностикумов и ИФА типа «сэндвич» определяли количественную концентрацию цитокинов в областях интереса. Результаты представлены на рисунке 12.

У интактных животных концентрация ФНО-альфа в исследуемых областях составляла в среднем 14,7 пг/мл, а тканевой уровень второго в каскаде медиатора запуска воспалительной реакции – ИЛ-1бета равнялась в среднем 7,8 пг/мл (рисунок 12 А, Б).

У животных контрольной серии со сформированной спонтанной судорожной активностью после внутрибрюшинного введения пилокарпина, наблюдали существенный и статистически значимый подъем тканевой концентрации указанных цитокинов – до в среднем 68,5 и 29,8 пг/мл

соответственно, что доказывало формирование воспалительного процесса в головном мозгу животных (рисунок 12 А, Б).

А



В

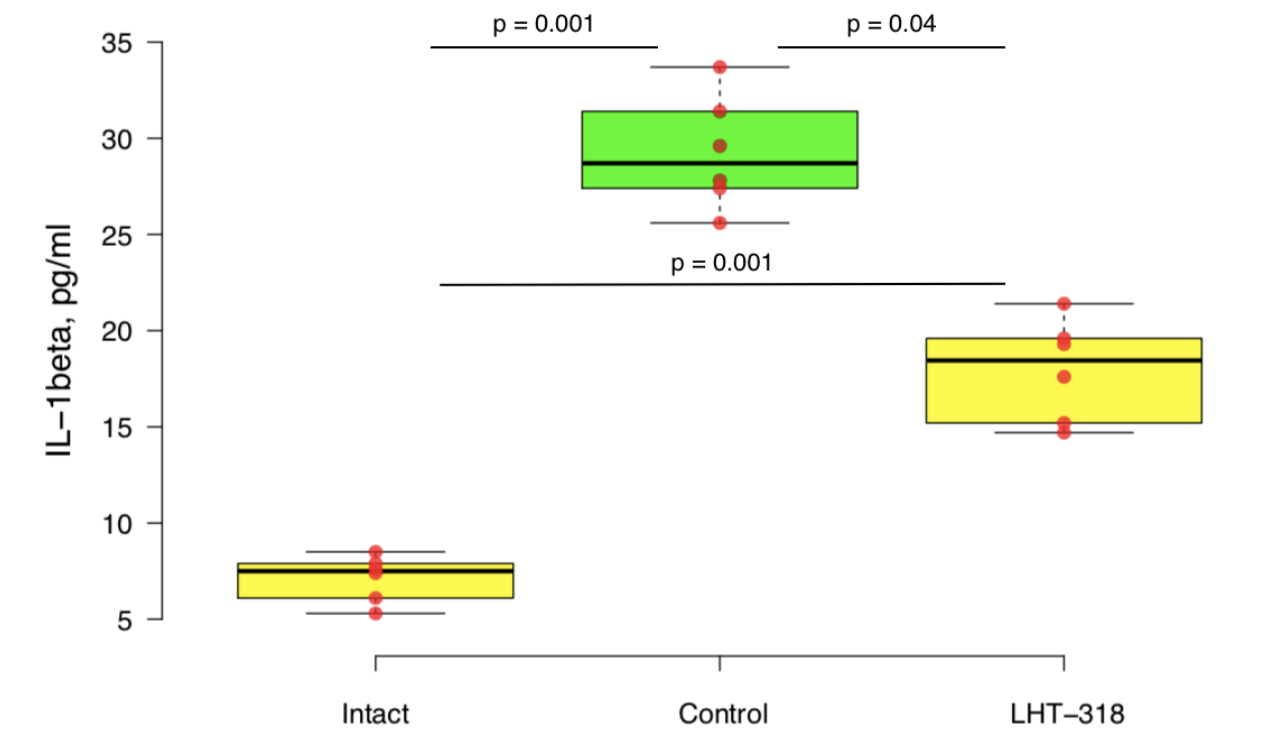


Рисунок 12 – Влияние ЛХТ-318 в дозе 22,5 мг/кг/сут на тканевую концентрацию ФНО-альфа и ИЛ-1бета; ANOVA, критерий Тьюки

Соединение ЛХТ-318 изучено в максимальной вводимой дозе – 22,5 мг/кг в сутки. 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 такового у интактных животных ($p = 0,05$ при сравнении со значениями интактных животных).

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.

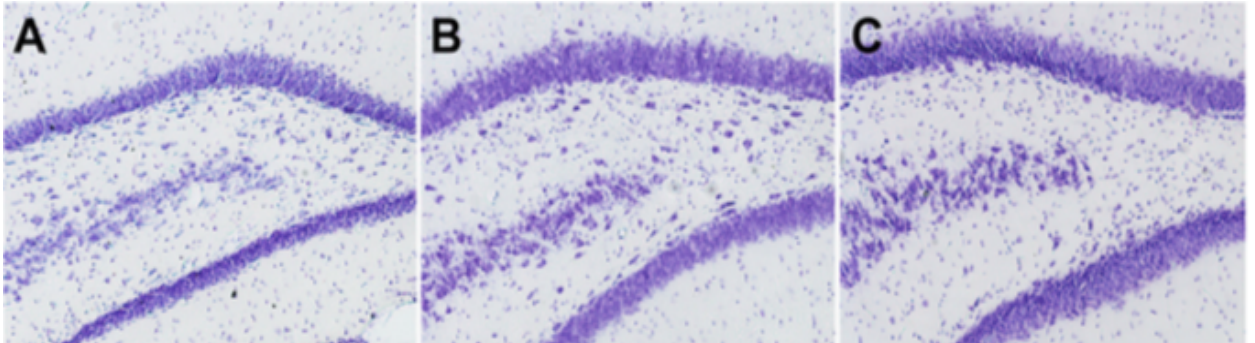
4.4 Влияние цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты на морфологию зон головного мозга, вовлеченных в эпилептогенез на пилокарпиновой экспериментальной модели

В рамках данного раздела изучили плотность нейронов в хилусе и зоне СА3 гиппокампа крыс, окрашенного крезил-виолетом по Нисслю, а также степень разрастания мшистых волокон клеток-гранул зубчатой борозды головного мозга экспериментальных животных, окрашенной методом нео-Тимм.

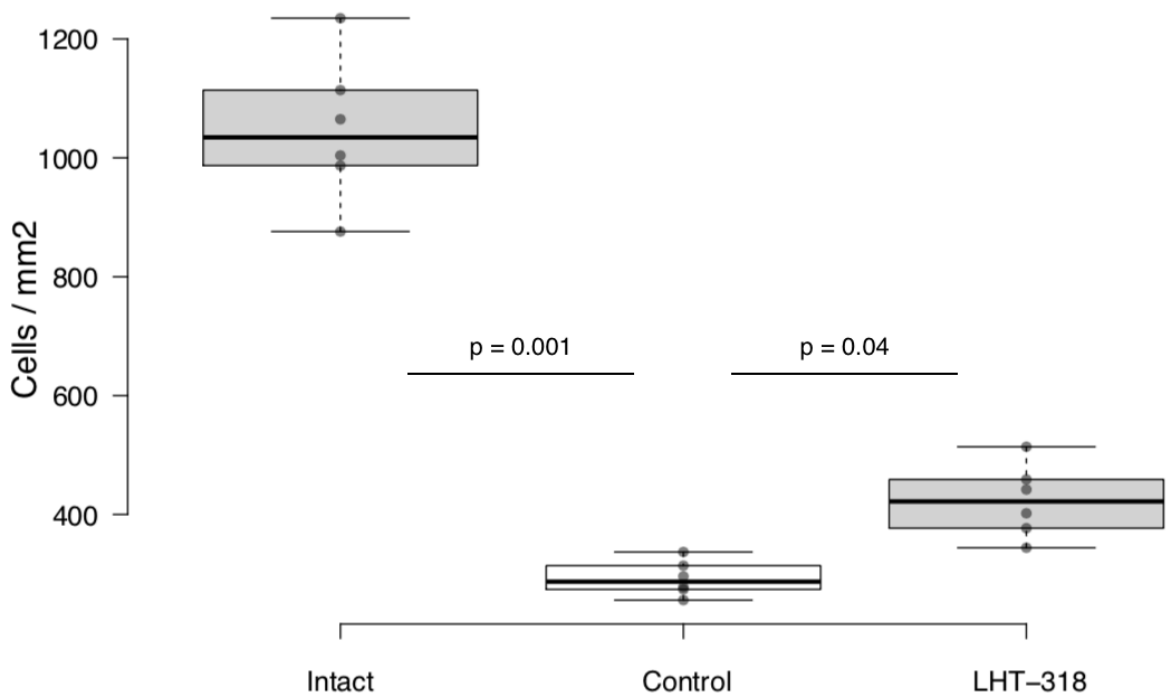
4.4.1 Плотность нейронов гиппокампа под действием ЛХТ-318

На рисунке 13 (А, Б) представлены результаты изучения плотности нейронов в отделах гиппокампа, вовлеченных в патологический процесс при

формировании эпилептической трансформации головного мозга, измеренной у крыс на 57 сутки после внутрибрюшинного введения пилокарпина гидрохлорида.



*Микропрепараты гиппокампа крыс, $\times 100$
(окраска по Нислю)*



*Плотность нейронов хилуса и СА3 зоны гиппокампа крыс,
клеток/мм² ($n = 6$ в каждой группе)*

Рисунок 13 – Плотность нейронов в отделах гиппокампа головного мозга экспериментальных крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом: А – интактные животные, В – контроль, С – ЛХТ-318 в дозе 22,5 мг/кг в сутки; одномерный дисперсионный анализ, критерий Ньюмена-Кейлса

Плотность нейронов в гиппокампе здоровых крыс колеблется в среднем в области 1022 нейронов на 1 мм². Морфологической основой пилокарпинового эпилептогенеза служит резкое снижение плотности нейронов в зонах, задействованных в патологический процесс (хилус и СА3 зона гиппокампа), до в среднем 287 клеток / мм² ($p = 0,001$ при сравнении со значениями интактных животных).

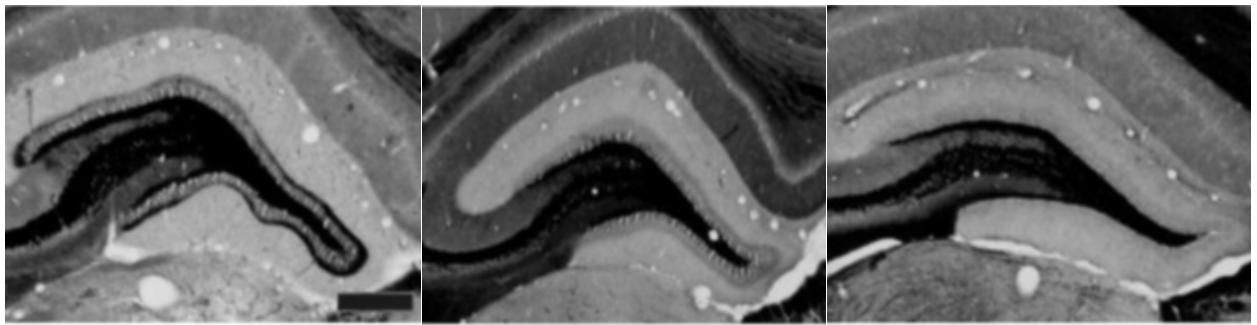
В группой экспериментальной терапии нам удалось показать, что терапия лабораторных животных цинковой солью 2-аминоэтансульфоновой кислоты в дозе 22,5 мг/кг в сутки в течение 4 недель – с 5 по 8 недели включительно, позволяет предотвращать критическую гибель нейронов, при этом их плотность в пересчете на 1 мм² составляет в среднем 443 нейронов ($p = 0,04$ при сравнении с контрольными значениями). 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).

4.4.2 Влияние курсового введения ЛХТ-318 крысам с пилокарпиновым эпилептогенезом на интенсивность разрастания мшистых волокон зубчатой борозды головного мозга

Также оценили плотность мшистых волокон клеток гранул молекулярного слоя зубчатой борозды головного экспериментальных животных с пилокарпиновым эпилептогенезом на фоне курсового профилактического внутрижелудочного введения цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты в суточной дозе 22,5 мг/кг в течение 4 недель.

Плотность изучаемых анатомических образований определена с использованием специального метода окрашивания – нео-Timm – при котором плотность разрастания волокон фиксировалась по интенсивности серого оттенка в зубчатой борозде на основе компьютерного анализа с

использованием специального программного продукта. На рисунке 14 представлены результаты исследования.

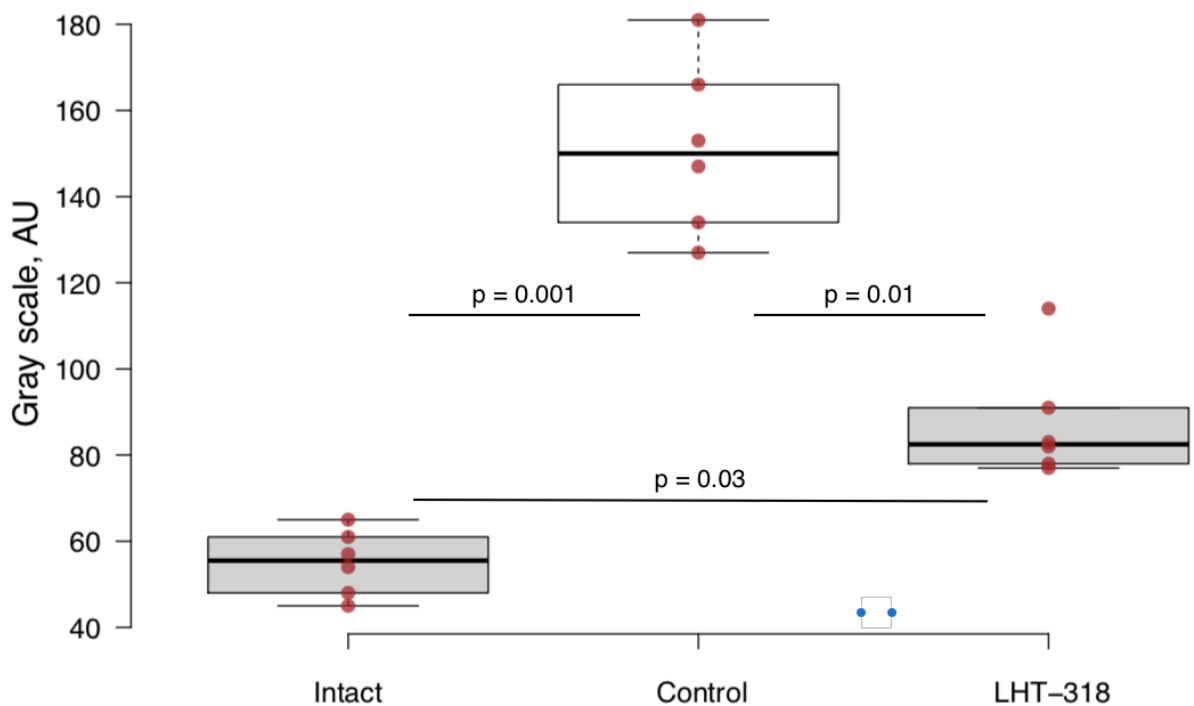


A

B

C

*Микропрепараты гиппокампа крыс, x100
(окраска нео-Timm)*



*Интенсивность серого окрашивания зубчатой борозды,
AU (n = 6 в каждой группе)*

Рисунок 14 – Интенсивность разрастания мшистых волокон в зубчатой борозде головного мозга экспериментальных крыс с пилокарпиновым эпилептогенезом: А – интактные животные, В – контроль, С – ЛХТ-318 в дозе 22,5 мг/кг в сутки; одномерный дисперсионный анализ, критерий Ньюмена-Кейлса

Мы установили, что у здоровых животных показатель интенсивности серого оттенка, коррелирующая с интенсивностью разрастания мшистых волокон в зубчатой борозде головного мозга составляет в среднем 56,4 AU. Формирование эпилептиформного расстройства у крыс под действием пилокарпина сопровождается избыточным развитием мшистых волокон в зоне интереса головного мозга – до 152,4 AU в среднем ($p = 0,001$ при сравнении со значениями интактных животных).

Экспериментальная терапия цинковой солью 2-аминоэтансульфоновой кислоты (ЛХТ-318) в дозе 22,5 мг/кг в сутки в течение 4 недель – с 5 по 8 недели включительно, позволяет предотвращать существенный рост интенсивности разрастания мшистых волокон, при этом их плотность в пересчете на 1 мм² в глубине оттенка серого составляет в среднем 83 AU ($p = 0,01$ при сравнении с контрольными значениями). Следует также сказать, что экспериментальная терапия не приводила к полной профилактике волокон клеток-гранул в зонах интереса ($p = 0,03$ при сравнении со значениями интактных животных).

Таким образом, мы показали, что цинковая соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты (соединение ЛХТ-318) при курсовом введении объективно предотвращает глубину морфологических изменений, характерных для пилокарпинового эпилептогенеза, при этом, следует подчеркнуть, что полной профилактики морфологических нарушений не наблюдается ни в одном случае.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ЦИНК-СОДЕРЖАЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ 2-АМИНОЭТАНСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ НЕЙРОНОВ И НЕКОТОРЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЫШЕННОЙ ВОЗБУДИМОСТИ

Настоящий раздел исследования выполнен совместно с сотрудниками лаборатории внутриклеточной сигнализации Пушкинского научного центра биологических исследований Российской академии наук³. В рамках серии эксперимента оценили влияние инкубации культуры кортикальных нейронов на кальциевую проводимость, выживаемость клеток в условиях, воспроизводящих повышенную судорожную готовность, а также концентрацию кальций-связывающего белка в нейронах.

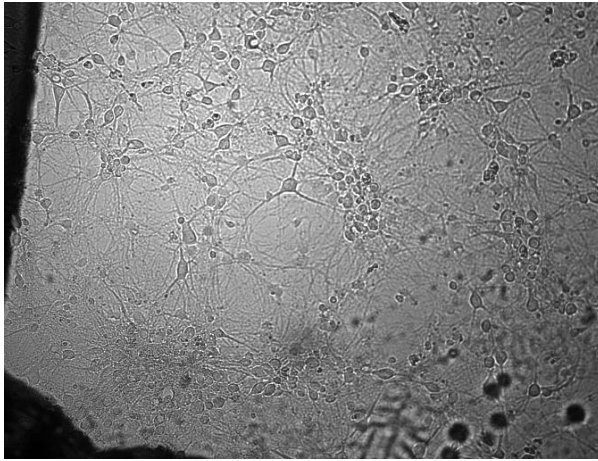
5.1 Выживаемость кортикальных нейронов в условиях эпилептогенеза под действием ЛХТ-318

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, с использованием реакции цитохимии.

Исходно мы установили уровень гибели кортикальных нейронов мышат C57Bl6 без явлений мутагенного эпилептогенеза на уровне 5-6% (при повторении опытов в трех отдельных культурах (рисунок 15).

У новорожденных мышей генерации G3 с ENU-индуцированным эпилептогенезом в безмагниевой среде гибель регистрировали значимую при

³ Мы признательны д.б.н. ведущему научному сотруднику Е.А. Туровскому за помощь в проведении настоящего раздела исследования



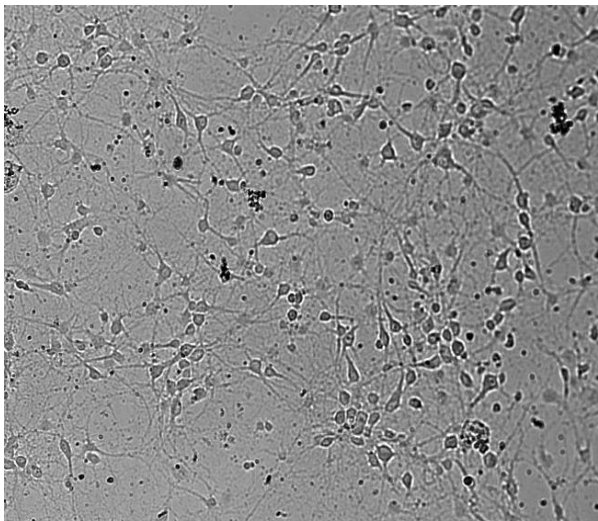
А. Интактные мыши C57Bl6,
проходящий свет



Б. Интактные мыши C57Bl6, иодид
пропидия

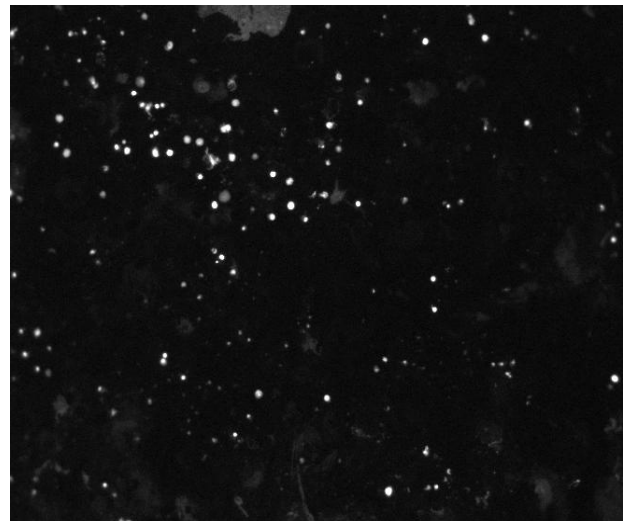
Примечание: слева представлена микрофотография нативной культуры (в проходящем свете), справа – культуры, окрашенной иодидом пропидия, люминисцентная микроскопия

Рисунок 15 – Общая морфологическая и иммуноцитохимическая характеристика культуры клеток коры перед началом эксперимента с воспроизведением эпилептогенеза, $n = 3$



Морфологическая структура
нейронной сети изменена

А. Мыши СЗН, проходящий свет



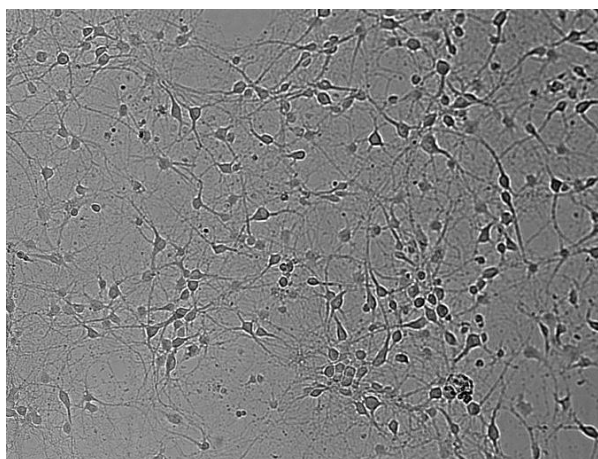
Наблюдается гибель 21-24%
кортикальных нейронов

Б. Мыши СЗН, иодид пропидия

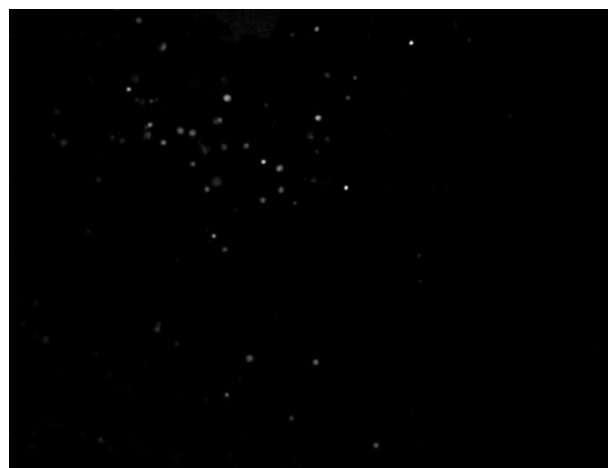
Рисунок 16 – Иммуноцитохимическая характеристика культуры клеток коры (воспроизведение эпилептогенеза), $n = 3$

сравнении с интактными мышами гибель нейронов, превышающую базовую – на уровне 21-24% (на трех независимых культурах) (рисунок 16).

На рисунке 17 (А, Б) представлены результаты изучения выживаемости кортикальных нейронов мышей генерации G3 с ENU-индуцированным эпилептогенезом в безмагниевой среде на фоне инкубации культуры с 1 мМ цинкового соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты ЛХТ-318. С помощью окрашивания пропидия иодидом иммуноцитохимическим методом мы установили, что вещество 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).



А. Интактные мыши C57Bl6,
проходящий свет



Б. Интактные мыши C57Bl6, иодид
пропидия

Примечание: слева представлена микрофотография нативной культуры (в проходящем свете), справа – культуры, окрашенной иодидом пропидия, люминисцентная микроскопия

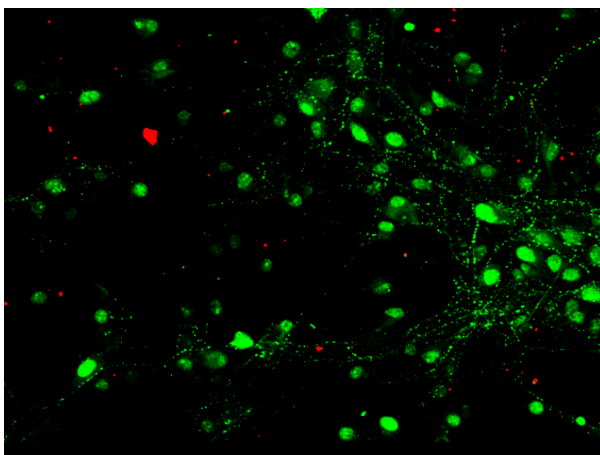
Рисунок 17 – Общая морфологическая и иммуноцитохимическая характеристика культуры клеток коры мышей с мутагенным эпилептогенезом на фоне инкубации с 1 мМ ЛХТ-318, n = 3

При этом следует подчеркнуть, что на фоне лекарственного воздействия наблюдали снижение фоновой гибели, что говорит о том, что цинковая соль 2-

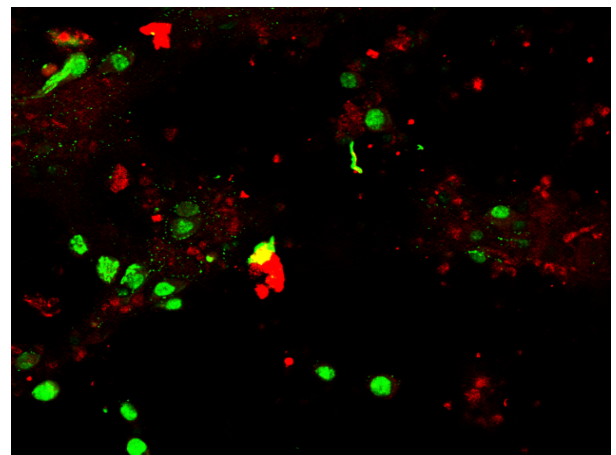
аминоэтансульфоновой кислоты в концентрации 1мМ оптимизирует условия инкубации культуры.

5.2 Влияние цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты на экспрессию парвальбумина

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 цинк-содержащего соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты 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 флуоресцентной метки (рисунок 18 А, Б).



А. Свечение интактной культуры

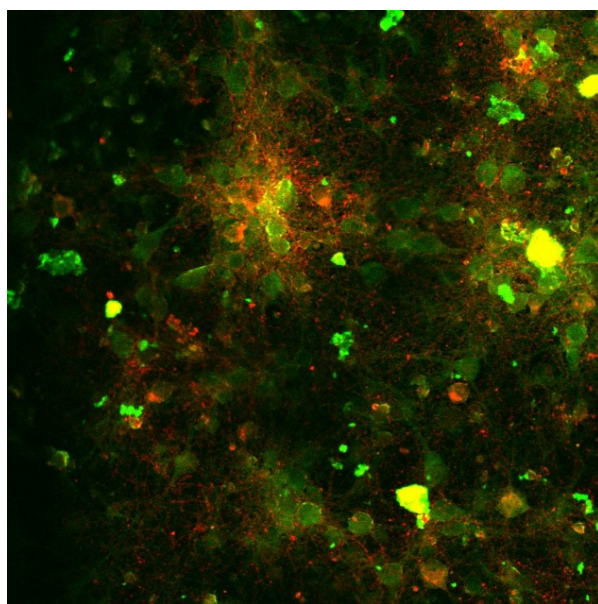


Б. Культура клеток на фоне ЭГ

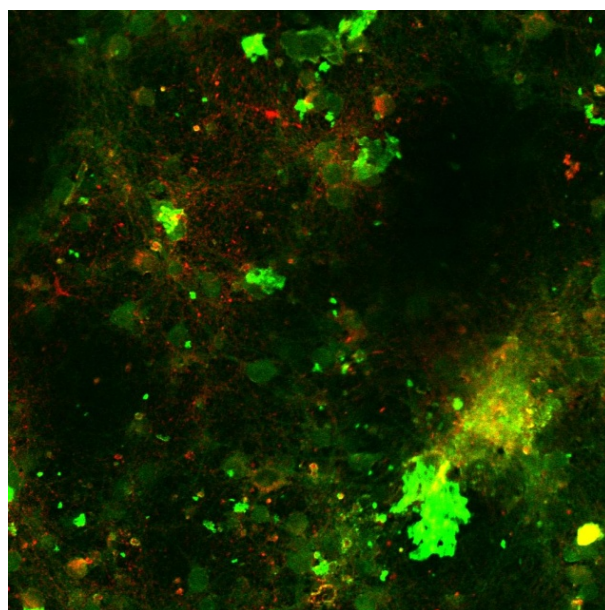
Рисунок 18 – Парвальбумин-экспрессирующие ГАМКергические нейроны культуры кортикальных нейронов мышат в условиях эпилептогенеза (ЭГ)

Как хорошо видно, нейроны коры головного мозга мышат C57Bl6 без мутагенного эпилептогенеза в насыщенной магнием среде дают яркое зеленое флюоресцентное окрашивание, свидетельствующее о высокой экспрессии парвальбумина (PV). Флюоресцентная картина культуры коры головного мозга мышей СЗН с ENU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом в безмагниевой среде характеризуется интенсивным красным окрашиванием ГАМКергических кортикальных нейронов, не экспрессирующих парвальбумин. Плотность и интенсивность зеленого и желтого окрашивания (парвальбумин-экспрессирующие ГАМКергические нейроны коры) существенно снижается.

Инкубирование кортикальных нейронов с раствором цинковой соли 2-аминоэтансульфоновой кислоты (ЛХТ-318 в концентрации 1 мМ) существенным образом отражается на экспрессии парвальбумина ГАМКергическими нейронами (рисунок 19 А, Б).



А. Флюоресцентное свечение



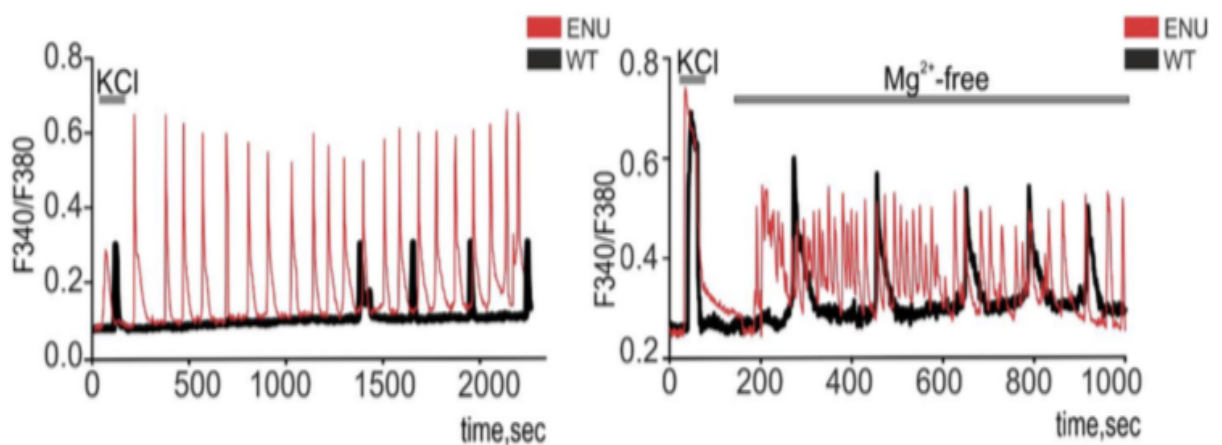
Б. ЛХТ-318 1 мМ

Рисунок 19 – Экспрессия парвальбумина ГАМКергическими нейронами культуры кортикальных нейронов на фоне ЛХТ-318

Экспериментальное фармакологическое воздействие повышает эксперссию парвальбумина популяцией ГАМКергических нейронов на в среднем 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.

5.3 Характеристика кальциевого ответа кортикальных нейронов на воздействие ЛХТ-318

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 20 А, Б).



А. Исходная активность

Б. Активность в безмагниевой среде

Рисунок 20 – Интенсивность кальциевых ответов культуры кортикальных нейронов мышей С57В16 без мутагенного эпилептогенеза (WT) и с ENU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом (ENU) в насыщенной магнием (А) и в безмагниевой (Б) среде

Как хорошо видно на рисунке 20А, спонтанная активность клеток, сопряженная с кальциевым электрогенезом у в культуре клеток C57B16 без мутагенного эпилептогенеза (мышей дикого типа) не превышает 0,02 в 1 минуту. В культуре кортикальных нейронов с ENU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом спонтанная активность повышается в 8,5 раз.

В безмагниевой среде интенсивность спонтанного Ca^{2+} -зависимого электрогенеза возрастает в геометрической прогрессии, и становится равной в среднем 0,34 в минуту для мышей C57B16 без мутагенного эпилептогенеза и 1,58 в минуту у мутантных мышей.

Инкубация культур кортикальных клеток в присутствии 1 мМ цинк-содержащего соединения ЛХТ-318 сопровождается подавлением спонтанной активности нейронов. При этом в зависимости от уровня экспрессии парвальбумина в популяции парвальбумин-содержащих ГАМКергических нейронов, а также источника клеток степень подавления и характер восстановления спонтанной активности меняются (рисунок 21 А, Б).

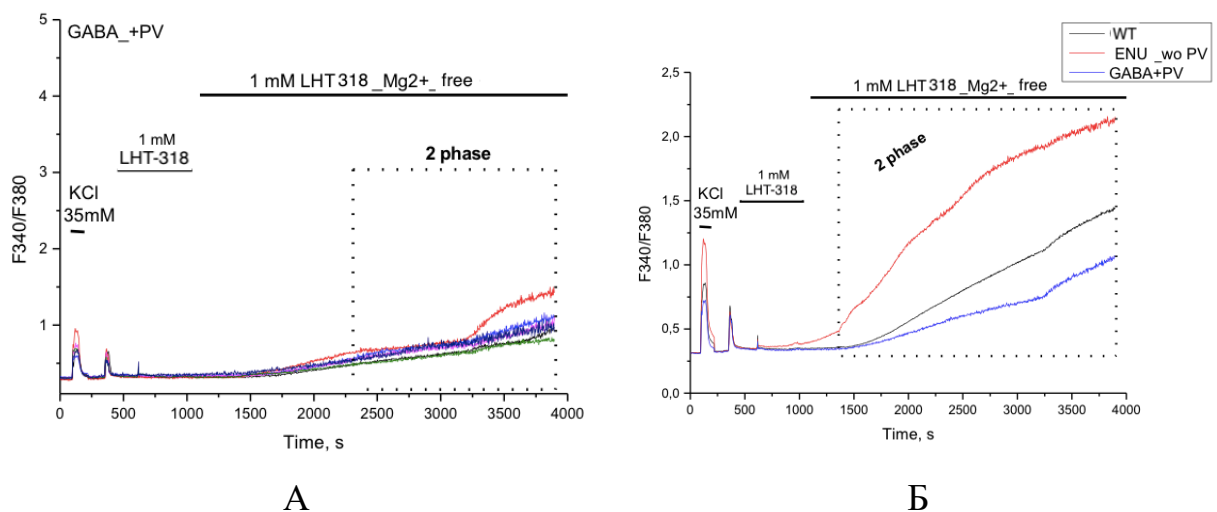


Рисунок 21 – Интенсивность спонтанных кальциевых ответов культуры кортикальных нейронов мышей C57B16 без мутагенного эпилептогенеза (WT) и с ENU-индуцированным мутагенным эпилептогенезом (ENU) в насыщенной магнием (А) и в безмагниевой (Б) среде на фоне инкубации с 1 мМ ЛХТ-318

В частности, 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 21 А).

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.

ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Противоэпилептические лекарственные средства способны эффективно контролировать течение патологического процесса у не более 65-70% пациентов, страдающих судорожным синдромом. Эти ограничения эффективности в полной мере относятся и к препаратам 2 и 3 поколений, что обуславливает высокую актуальность поиска новых к подходов к патогенетической терапии эпилепсии и к разработке новых перспективных лекарственных средств [21]. Помимо этого, широкое обсуждение в научном сообществе в настоящее время сконцентрировано на проблеме эпилептогенной трансформации центральной нервной системы (ЦНС) на фоне приема антиконвульсантов, что также придает мощный стимул научно-практическому поиску в этой предметной области [22].

Как известно, эпилептогенез – это устойчивый процесс, в результате которого происходит конверсия нормального головного мозга (ГМ) человека в так называемый «эпилептический ГМ» [23, 24]. Следовательно, фармакологическая модификация эпилептогенеза очевидно может препятствовать формированию патологически-измененного ГМ и развитию самого заболевания.

Первичное повреждение головного мозга в виде эпилептического статуса, травматического повреждения, нейроинфекции или ишемической атаки способно запускать сложный каскадный процесс эпилептогенеза [23, 24]. Необходимо подчеркнуть, что первичные провокационные факторы, продолжающие воздействие на ЦНС и на фоне уже сформированного судорожного синдрома самым негативным образом влияют на его хронизацию, учащение приступов и утяжеление течения эпилепсии [24]. Вследствие первичного повреждения развиваются две последовательные патофизиологические фазы в развитии заболевания: а) острая фаза, которая длится в течение от нескольких часов до нескольких недель, и объединяет такие явления как нейродегенерацию, элевацию воспалительной активности и

транскрипционные события; б) хроническая фаза – длится в течение нескольких месяцев и характеризуется последовательностью событий, как правило включающих нейрогенез, разрастание мшистых волокон, реорганизацию нейрональных сетей и глиоз [25].

Причем, установлена корреляция между разрастанием мшистых волокон в тех областях ГМ, где они никогда не существовали и судорожной активностью. Помимо этого, установлена абберантная локализация зернистых клеток в зубчатой борозде ГМ (так называемые эктопические клетки-зерна). Эти клетки вследствие образования патологических связей с нейронами молекулярного слоя зубчатой борозды и нейронами СА3 слоя гиппокампа, принимают участие в формировании имеющих патологическое значение возбуждающих кругов повышенной судорожной активности [26].

Помимо прочего, в прогрессировании эпилептогенеза большая роль принадлежит глиозу, поскольку астроциты способны продуцировать и высвобождать целый ряд активных нейротрансмиттеров и модуляторов, в частности глутаминовую кислоту (глутамат), который, будучи основным возбуждающим нейротрансмиттером, играет ключевую роль в эпилептогенезе и запуске эпизодов судорожного синдрома [25]. Несмотря на то, что первичный триггер (например, острая ишемическая атака) приводит в конечном счете к повышению количества вновь образующихся нейронов, нейрогенез в гиппокампе значительно снижается параллельно с формированием хронической эпилепсии, что также рассматривается как одна из нерешенных научных проблем, требующих самого внимательного рассмотрения [25].

Стадии эпилептогенеза могут быть хронологически ассоциированы с генетическими модификациями в виде изменения экспрессии различных генов. Интересно, что в течение эпилептогенеза целый ряд генов самым драматическим образом изменяют свою экспрессию. К таким генам относятся, например, гены mTOR (мишень для рапамицина у млекопитающих), инсулиноподобного фактора роста 1, трансформирующего фактора роста бета,

p38 MAPK (тирозиновая протеинкиназа митоген-активирующего протеина p38) и Jak-STAT (молекула – трансдюсер сигнала янус-киназы и активатор белков транскрипции) [26].

Настоящее исследование посвящено обоснованию антиконвульсивной активности двух оригинальных металлосодержащих замещенных соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты, у которых ранее было выявлено антиишемическое, противовоспалительное действие при транзиторном нарушении мозгового кровообращения в эксперименте [137], а также способность предотвращать нейродегенеративные процессы в ЦНС на экспериментальной модели бокового амиотрофического склероза [138]. Этот комплекс установленных фармакологических эффектов, а также понимание ряда механизмов действия соединений привели нас к мысли о том, что помимо описанных в спектре терапевтических эффектов магниевого и цинкового дериватов сульфокетокислоты может присутствовать и противосудорожный.

Развитие судорожного синдрома, повышенной возбудимости моторных и иных зон головного мозга является, как известно, следствием целого комплекса этиологических и патогенетических факторов. Ведущими среди них являются ишемические, травматические, токсические, инфекционные поражения ЦНС, ведущие к формированию морфологических изменений и перестроек клеточного ландшафта структур головного мозга, запуск внутриклеточных сигнальных механизмов повышения возбудимости и сетевое закрепление подобной активности.

Указанные обстоятельства обуславливают методологические сложности, встающие перед исследователем при планировании работы по изучению новых фармакологических веществ. С одной стороны, важно воспроизвести проявление патологического состояния – судорожный синдром, но, при этом не менее важно, смоделировать экспериментальный эпилептогенез таким образом, чтобы можно было оценить и морфологические, молекулярные механизмы и точки приложения потенциального фармакологического агента. Вот почему при планировании настоящей

работы, построении ее дизайна мы воспользовались двумя моделями эпилептогенеза, описанными в зарубежной литературе как наиболее адекватные, позволяющие провести комплексное изучение особенностей реализации противосудорожного действия веществ.

Работа включала 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-аминоэтансульфоново́й кислоты в дозах, составляющих 2,5% от показателя ЛД₅₀, определенного для мышей. По результатам выполнения этапа было отобрано одно вещество с наибольшей противосудорожной активностью для продолжения проведения экспериментальных исследований.

На втором этапе для 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-аминоэтансульфоново́й 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.

Объектом исследования в представленной работе были два соединения сульфокетокислоты – 2-аминоэтановой кислоты, синтезированные в лаборатории химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО ВНИЦ БАВ (Россия, г. Старая Купавна Московской области): магния бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-317) цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318).

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 соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты – данные Громовой И.А., 2019, Крайновой Ю.С., 2020 и Семелевой Е.В., 2021) [17-19], а также данными об оптимальных клинических дозах карбамазепина с учетом правил межвидового биологического переноса доз [120].

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 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 С57В16 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.

С использованием программы PASS провели количественный анализ структура – активность магниевого – магния бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-317) – и цинкового – цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоноата (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318) – соединений 2-аминоэтансульфоновой кислоты. При проведении количественного анализа структура – активность магния бис-ацетамино-2-амино-этансульфоноат (соединение ЛХТ-317) было установлено, что с вероятностью, превышающей 60% у соединений 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. По данным количественного прогноза соединения цинка может применяться для лечение 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. 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.

В результате, на основании проведения скринингового этапа исследования, в качестве соединения, обладающего наибольшим фармакологическим потенциалом для изучения в качестве потенциального противосудорожного средства, был выбран цинка цикло-бис-ацетамино-2-аминоэтансульфоат (шифр учреждения-разработчика ЛХТ-318).

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 референтным противоэпилептическим средством карбамазепином; оценили также влияние соединения на поведенческие реакции грызунов. 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 активности сопоставимо с препаратом сравнения карбамазепином [139].

Также в рамках данного раздела работы изучили влияние цинка цикло-бис-ацетамин-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.

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.

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.

Таким образом, в структуре противозепилептогенного 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. 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 такового у интактных животных ($p = 0,05$ при сравнении со значениями интактных животных).

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 ГМ подопытных крыс по Нисслию и способом neo-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 мм² 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, с использованием реакции цитохимии.

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 цинковая соль 2-аминоэтансульфоновой кислоты в концентрации 1мМ оптимизирует условия инкубации культуры [138].

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 цинк-содержащего соединения 2-аминоэтансульфоновой кислоты 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 флуоресцентной метки.

Экспериментальное фармакологическое воздействие повышает экспрессию парвальбумина популяцией ГАМКергических нейронов на в среднем 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. 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 экспрессирующих парвальбумин нейронов превышал исходные уровни.

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.

6.1 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования

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 ЛД₅₀, 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 ЛД₅₀, 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 безмагниевой 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 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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy / R.S. Fisher, C. Acevedo, A. Arzimanoglou et al. // *Epilepsia*. – 2014. – Vol. 55. – P. 475-482.
2. Hauser, W.A. First seizure definitions and worldwide incidence and mortality / W.A. Hauser, E. Beghi // *Epilepsia*. – 2008. – Vol. 49. – P. 8-12.
3. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures / R.H. Mattson, J.A. Cramer, J.F. Collins et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1985. – Vol. 313. – P. 145-151.
4. Kwan, P. Drug treatment of epilepsy: when does it fail and how to optimize its use / P. Kwan, M.J. Brodie // *CNS Spectr.* – 2004. – Vol. 9. – P. 110-119.
5. Development of new treatment approaches for epilepsy: unmet needs and opportunities / J.A. French, H.S. White, H. Klitgaard et al. // *Epilepsia*. – 2013. – Vol. 54. – P. 3-12.
6. Issues related to development of new antiseizure treatments / K.S. Wilcox, T. Dixon-Salazar, G.J. Sills et al. // *Epilepsia*. – 2013. – Vol. 54. – P. 24-34.
7. 30 years of second-generation antiseizure medications: impact and future perspectives / E. Perucca, M.J. Brodie, P. Kwan et al. // *Lancet Neurol.* – 2020. – Vol. 19. – P. 544-556.
8. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I: treatment of new onset epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society / J.A. French, A.M. Kanner, J. Bautista et al. // *Neurology*. – 2004. – Vol. 62. – P. 1252-1260.
9. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: treatment of refractory epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of

Neurology and the American Epilepsy Society / J.A. French, A.M. Kanner, J. Bautista et al. // *Neurology*. – 2004. – Vol. 62. – P. 1261-1273.

10. Practice guideline update summary: efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I: treatment of new-onset epilepsy: report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society / A.M. Kanner, E. Ashman, D. Gloss et al. // *Neurology*. – 2018. – Vol. 91. – P. 74-81.

11. Practice guideline update summary: efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: treatment-resistant epilepsy: report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society / A.M. Kanner, E. Ashman, D. Gloss et al. // *Neurology*. – 2018. – Vol. 91. – P. 82-90.

12. Fisher, R.S. An overview of the 2017 ILAE operational classification of seizure types / R.S. Fisher // *Epilepsy Behav.* – 2017. – Vol. 70. – P. 271-273.

13. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types / R.S. Fisher, J.H. Cross, C. D'Souza et al. // *Epilepsia*. – 2017. – Vol. 58. – P. 531-542.

14. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology / R.S. Fisher, J.H. Cross, J.A. French et al. // *Epilepsia*. – 2017. – Vol. 58. – P. 522-530.

15. Hakimi, T. Efficacy and tolerability of antiseizure drugs / T. Halimi // *Ther. Adv. Neurol. Disord.* – 2021. – Vol. 14. – P. 1-21.

16. 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.

17. Громова, И.А. Нейропротекторная активность соединений таурина при реперфузионном повреждении головного мозга в эксперименте : дис. ... канд. мед. наук. : 14.03.06 / Громова Ирина Александровна. – Саранск, 2020. – 130 с.

18. Семелева, Е.В. : дис. ... д-ра мед. наук. : 14.03.06 / Семелева Елена Владимировна. – Москва, 2021. – 326 с.
19. Крайнова, Ю.С. Эффективность цинковой соли таурина при ишемическом поражении головного мозга (экспериментальное *in vivo* и *in vitro*) : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.06 / Крайнова Юлия Сергеевна. – Саранск, 2020. – 128 с.
20. Гераськина, М.М. Механизмы церебропротекторного действия циклического магнисодержащего соединения сульфокислоты. – Мария Михайловна Гераськина : дис. ... канд. мед. наук, 14.03.06 – Обнинск, 2019. – 126 с.
21. Kwan, P. Early identification of refractory epilepsy / P. Kwan, M.J. Brodie // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342. – P. 314-319.
22. Neuroprotective effects of antiepileptic drugs in epilepsy / B. Miziak, A. Konarzewska, M. Ułamek-Kozioł et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 2340.
23. Neuroinflammation imaging markers for epileptogenesis / M.J. Коерр, E. Arstad, J.P. Bankstahl et al. // *Epilepsia.* – 2017. – Vol. 5. – P. 11-19.
24. Development of spontaneous seizures after experimental status epilepticus: Implications for understanding epileptogenesis / P.A. Williams, J.L. Hellier, A.M. White et al. // *Epilepsia.* – 2007. – Vol. 48. – P. 157-163.
25. Mechanisms of epileptogenesis and preclinical approach to antiepileptogenic therapies / K. Łukawski, M. Andres Mach, M. Czuczwar et al. // *Pharmacol. Rep.* – 2018. – Vol. 70. – P. 284-293.
26. Koyama, R. Dentate circuitry as a model to study epileptogenesis / R. Koyama // *Biol. Pharm. Bull.* – 2016. – Vol. 39. – P. 891-896.
27. A viewpoint on rational and irrational fixed-drug combinations / B. Błaszczyk, B. Miziak, P. Czuczwar et al. // *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 11. – P. 761-771.

28. Exploring the latest avenues for antiepileptic drug discovery and development / K. Łukawski, P. Gryta, J. Łuszczki, S.J. Czuczwar // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2016. – Vol. 11. – P. 369-382.
29. Łukawski, K. Developing precision treatments for epilepsy using patient and animal models / K. Łukawski, S.J. Czuczwar // *Expert Rev. Neurother.* – 2020. – P. 1-10.
30. EEG markers predictive of epilepsy risk in pediatric cerebral malaria—A feasibility study / A.A. Patel, A. Jannati, S.C. Dhamne et al. // *Epilepsy Behav.* – 2020. – Vol. 113. – P. 107536.
31. Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy / C. Brandt, M. Nozadze, N. Heuchert et al. // *J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 30. – P. 8602-8612.
32. Prevention of status epilepticus-induced brain edema and neuronal cell loss by repeated treatment with high-dose levetiracetam / K. Itoh, M. Inamine, W. Oshima et al. // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 1608. – P. 225-234.
33. Basic mechanisms of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions: An update / W. Lason', M. Dudra-Jastrzebska, K. Rejdak, S.J. Czuczwar // *Pharmacol. Rep.* – 2011. – Vol. 63. – P. 271-292.
34. Targeting pharmacoresistant epilepsy and epileptogenesis with a dual-purpose antiepileptic drug / A. Doeser, G. Dickhof, M. Reitze et al. // *Brain.* – 2015. – Vol. 138. – P. 371-387.
35. Lamotrigine inhibits postsynaptic AMPA receptor and glutamate release in the dentate gyrus / C.Y. Lee, W.M. Fu, C.C. Chen et al. // *Epilepsia.* – 2008. – Vol. 49. – P. 888-897.
36. The effects of lamotrigine and ethosuximide on seizure frequency, neuronal loss, and astrogliosis in a model of temporal-lobe epilepsy / J. Wang, Y. Chen, Q. Wang et al. // *Brain Res.* – 2019. – Vol. 1712. – P. 1-6.

37. Inhibitory effect of anti-seizure medications on ionotropic glutamate receptors: Special focus on AMPA receptor subunits / K. Fukushima, K. Hatanaka, K. Sagane, K. Ido // *Epilepsy Res.* – 2020. – Vol. 167. – P. 106452.
38. Losartan prevents acquired epilepsy via TGF- β signaling suppression / G. Bar-Klein, L.P. Cacheaux, L. Kamintsky et al. // *Ann. Neurol.* – 2014. – Vol. 75. – P. 864-875.
39. Traumatic brain injury in the rat: Characterization of a midline fluid-percussion model / T.K. McIntosh, L. Noble, B. Andrews, A.I. Faden // *Cent. Nerv. Syst. Trauma.* – 1987. – Vol. 4. – P. 119-134.
40. Blood-brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions / M. Krueger, W. Härtig, A. Reichenbach et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – P. e56419.
41. Blood-brain barrier and intrathecal immune response in patients with neuroinfections / T. Valkov, J. Hristova, T. Tcherveniakova, D. Svinarov // *Infez. Med.* – 2017. – Vol. 25. – P. 320-325.
42. Tran- scriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis / L.P. Cacheaux, S. Ivens, Y. David et al. // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29. – P. 8927-8935.
43. Antiepileptogenic and neuroprotective effects of losartan in kainate model of temporal lobe epilepsy / J.D. Tchekalarova, N.B. Ivanova, D.M. Pechlivanova et al. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2014. – Vol. 127. – P. 27-36.
44. Long-term treatment with losartan attenuates seizure activity and neuronal damage without affecting behavioral changes in a model of co-morbid hypertension and epilepsy / J.D. Tchekalarova, N. Ivanova, D. Atanasova et al. // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2016. – Vol. 36. – P. 927-941.
45. The angiotensin II type I receptor antagonist losartan retards amygdala kindling-induced epileptogenesis / T. Nozaki, H. Ura, I. Takumi et al. // *Brain Res.* – 2018. – Vol. 1694. – P. 121-128.
46. Laplante, M. mTOR signaling in growth control and disease / M. Laplante, D.M. Sabatini // *Cell.* – 2012. – Vol. 149. – P. 274-293.

47. Rapamycin reveals an mTOR-independent repression of Kv1.1 expression during epileptogenesis / N.M. Sosanya, D.H. Brager, S. Wolfe et al. // *Neurobiol. Dis.* – 2015. – Vol. 73. – P. 96-105.
48. Inhibition of mammalian target of rapamycin reduces epileptogenesis and blood-brain barrier leakage but not microglia activation / E.A. Van Vliet, G. Forte, L. Holtman et al. // *Epilepsia.* – 2012. – Vol. 53. – P. 1254-1263.
49. Heng, K. High-dose rapamycin blocks mossy fiber sprouting but not seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy / K. Heng, M.M. Haney, P.S. Buckmaster // *Epilepsia.* – 2013. – Vol. 54. – P. 1535-1541.
50. Buckmaster, P.S. Rapamycin suppresses mossy fiber sprouting but not seizure frequency in a mouse model of temporal lobe epilepsy / P.S. Buckmaster, F.H. Lew // *J. Neurosci.* – 2011. – Vol. 31. – P. 2337-2347.
51. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus / K.H. Jung, K. Chu, S.T. Lee et al. // *Neurobiol. Dis.* – 2006. – Vol. 23. – P. 237-246.
52. Effect of orally administered N-acetylcysteine on chronic bronchitis: A Meta-analysis / J. Wei, C.S. Pang, J. Han, H. Yan // *Adv. Ther.* – 2019. – Vol. 36. – P. 3356-3367.
53. The involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury / S. Nomura, S. Shimakawa, R. Miyamoto et al. // *Brain Res.* – 2014. – Vol. 1590. – P. 65-74.
54. The involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury / L.F. Silva, M.S. Hoffmann, L.M. Rambo et al. // *J. Neurol. Sci.* – 2011. – Vol. 308. – P. 35-40.
55. Minocycline in neurodegenerative and psychiatric diseases: An update / D. Romero-Miguel, N. Lamanna-Rama, M. Casquero-Veiga et al. // *Eur J Neurol.* – 2021. – Vol. 28. – P. 1056-1081.

56. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus / N. Wang, X. Mi, J. Gu et al. // *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 87. – P. 144-156.

57. Minocycline fails to exert antiepileptogenic effects in a rat status epilepticus model / V. Russmann, J. Goc, K. Boes et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 771. – P. 29-39.

58. Proof-of-concept that network pharmacology is effective to modify development of acquired temporal lobe epilepsy / A. Schidlitzki, P. Bascuñana, P.K. Srivastava et al. // *Neurobiol. Dis.* – 2020. – Vol. 134. – P. 104664.

59. Systematic evaluation of rationally chosen multitargeted drug combinations: A combination of low doses of levetiracetam, atorvastatin and ceftriaxone exerts antiepileptogenic effects in a mouse model of acquired epilepsy / L. Welzel, D.H. Bergin, A. Schidlitzki et al. // *Neurobiol. Dis.* – 2021. – Vol. 149. – P. 105227.

60. Borowicz-Reutt, K.K. Role of oxidative stress in epileptogenesis and potential implications for therapy / K.K. Borowicz-Reutt, S.J. Czuczwar // *Pharmacol. Rep.* – 2020. – Vol. 72. – P. 1218-1226.

61. Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol / T. Meng, D. Xiao, A. Muhammed et al. // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – P. 229.

62. Protective effect of resveratrol against kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. *Neurochem* / Z. Wu, Q. Xu, L. Zhang et al. // *Res.* – 2009. – Vol. 34. – P. 1393-1400.

63. Saha, L. Understanding the anti-kindling role and its mechanism of resveratrol in pentylenetetrazole induced- kindling in a rat model / L. Saha, A. Chakrabarti // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2014. – Vol. 120. – P. 57-64.

64. Effects of rapamycin and curcumin on inflammation and oxidative stress in vitro and in vivo - in search of potential anti-epileptogenic strategies for temporal lobe epilepsy / C.M. Drion, J. van Scheppingen, A. Arena et al. // *J. Neuroinflamm.* – 2018. – Vol. 15. – P. 212.

65. Protection against cognitive impairment and modification of epileptogenesis with curcumin in a post-status epilepticus model of temporal lobe epilepsy / Z. Jiang, M. Guo, C. Shi et al. // *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 310. – P. 362-371.
66. Houghton, C.A. Sulforaphane: Translational research from laboratory bench to clinic / C.A. Houghton, R.G. Fassett, J.S. Coombes // *Nutr. Rev.* – 2013. – Vol. 71. – P. 709-726.
67. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy / A. Pauletti, G. Terrone, T. Shekh-Ahmad et al. // *Brain*. – 2019. – Vol. 142. – P. e39.
68. Selective inhibition of mTORC1/2 or PI3K/mTORC1/2 signaling does not prevent or modify epilepsy in the intrahippocampal kainate mouse model / B. Gericke, C. Brandt, W. Theilmann et al. // *Neuropharmacology*. – 2020. – Vol. 162. – P. 107817.
69. Disease-modifying effects of a novel T-type calcium channel antagonist, Z944, in a model of temporal lobe epilepsy / P.M. Casillas-Espinosa, S.R. Shultz, E.L. Braine et al. // *Prog. Neurobiol.* – 2019. – Vol. 182. – P. 101677.
70. Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis / R.L. Williams-Karnesky, U.S. Sandau, T.A. Lusardi et al. // *J. Clin. Investig.* – 2013. – Vol. 123. – P. 3552-3563.
71. Systemic delivery of antagomirs during blood-brain barrier disruption is disease-modifying in experimental epilepsy / C.R. Reschke, L.F.A. Silva, V.R. Vangoor et al. // *Mol. Ther.* – 2021. – Vol. 29. – P. 2041-2052.
72. Yamada, K. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes / K. Yamada, T. Nabeshima // *J. Pharmacol. Sci.* – 2003. – Vol. 91. – P. 267-270.
73. Binder, D.K. Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trk receptors in the mossy fiber pathway of adult rat hippocampus / D.K. Binder, M.J. Routbort, J.O. McNamara // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19. – P. 4616-4626.

74. Transient inhibition of TrkB kinase after status epilepticus prevents development of temporal lobe epilepsy / G. Liu, B. Gu, X.-P. He et al. // *Neuron*. – 2013. – Vol. 79. – P. 31-38.

75. Regression of epileptogenesis by inhibiting tropomyosin kinase B signaling following a seizure / K. Krishnamurthy, Y.Z. Huang, S.C. Harward et al. // *Ann. Neurol.* – 2019. – Vol. 86. – P. 939-950.

76. Sheng, M.; Greenberg, M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990, 4, 477–485.

77. c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map / K.J. Kovács // *Neurochem. Int.* – 1998. – Vol. 33. – P. 287-297.

78. Long-term decrease in immediate early gene expression after electroconvulsive seizures / J.B. Calais, S.S. Valvassori, W.R. Resende et al. // *J. Neural Transm.* – 2013. – Vol. 120. – P. 259-266.

79. Temporal gene expression profile after acute electroconvulsive stimulation in the rat / M. Dyrvig, S.H. Christiansen, P.D.P. Woldbye, J. Lichota // *Gene*. – 2014. – Vol. 539. – P. 8-14.

80. Prolonged expression of AP-1 transcription factors in the rat hippocampus after systemic kainate treatment / K.R. Pennypacker, L. Thai, J.S. Hong, M.K. McMillian // *J. Neurosci.* – 1994. – Vol. 14. – P. 3998-4006.

81. Fos induction following systemic kainic acid: Early expression in hippocampus and later widespread expression correlated with seizure / J.O. Willoughby, L. Mackenzie, A. Medvedev, J.J. Hiscock // *Neuroscience*. – 1997. – Vol. 77. – P. 379-392.

82. C-fos, Jun D and HSP72 immunoreactivity, and neuronal injury following lithium-pilocarpine induced status epilepticus in immature and adult rats / C. Dubé, V. André, L. Covolan et al. // *Mol. Brain Res.* – 1998. – Vol. 63. – P. 139-154.

83. Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in lithium-pilocarpine seizures in adult rats / J. Motte, M.J.D.S. Fernandes, T.Z. Baram, A. Nehlig // *Brain Res.* – 1998. – Vol. 793. – P. 61-72.

84. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression / S.C. Baraban, M.R. Taylor, P.A. Castro, H. Baier // *Neuroscience*. – 2005. – Vol. 131. – P. 759-768.
85. Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylentetrazol-kindled seizures / J. Szyndler, P. Maciejak, D. Turzyn'ska et al. // *Epilepsy Behav.* – 2009. – Vol. 16. – P. 216-224.
86. The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys / V.N. Barros, M. Mundim, L.T. Galindo et al. // *Front. Cell. Neurosci.* – 2015. – Vol. 9. – P. 1-8.
87. Spatiotemporal Correlation of Epileptiform Activity and Gene Expression in vitro / S. Schlabitz, L. Monni, A. Ragot et al. // *Front. Mol. Neurosci.* – 2021. – Vol. 14. – P. 1-17.
88. Pretreatment with a glutamine synthetase inhibitor MSO delays the onset of initial seizures induced by pilocarpine in juvenile rats / M.J. Pawlik, M. Obara-Michlewska, M.P. Popek et al. // *Brain Res.* – 2021. – Vol. 1753. – P. 147253.
89. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25. – P. 402-408.
90. Trigeminal nerve stimulation induces Fos immunoreactivity in selected brain regions, increases hippocampal cell proliferation and reduces seizure severity in rats / B. Mercante, P. Enrico, G. Floris et al. // *Neuroscience*. – 2017. – Vol. 361. – P. 69-80.
91. Fos induction and persistence, neurodegeneration, and interneuron activation in the hippocampus of epilepsy-resistant versus epilepsy-prone rats after pilocarpine-induced seizures / P.F. Fabene, A. Andrioli, M.R. Priel et al. // *Hippocampus*. – 2004. – Vol. 14. – P. 895-907.
92. Keezer, M.R. Comorbidities of epilepsy: Current concepts and future perspectives / M.R. Keezer, S.M. Sisodiya, J.M. Sander // *Lancet Neurol.* – 2016. – Vol. 15. – P. 106-115.

93. Ives-Deliperi, V. Mechanisms of cognitive impairment in temporal lobe epilepsy: A systematic review of resting-state functional connectivity studies / V. Ives-Deliperi, J.T. Butler // *Epilepsy Behav.* – 2021. – Vol. 115. – P. 107686.
94. Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat / A. Pitkänen, I. Kharatishvili, S. Narkilahti et al. // *Epilepsy Res.* – 2005. – Vol. 63. – P. 27-42.
95. Löscher, W. Basic pharmacology of valproate: A review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy / W. Löscher // *CNS Drugs.* 2002. – Vol. 16. – P. 669-694.
96. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked / S. Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 49. – P. 1603-1616.
97. Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration / R. Santín-Márquez, A. Alarcón-Aguilar, N.E. López-Diazguerrero et al. // *Geroscience.* – 2019. – Vol. 41. – P. 655-670.
98. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: The reasons why / G. Aldini, A. Altomare, G. Baron et al. // *Free Radic. Res.* – 2018. – Vol. 52. – P. 751-762.
99. Curcumin: An inflammasome silencer / S. Hasanzadeh, M.I. Read, A.R. Bland et al. // *Pharmacol. Res.* – 2020. – Vol. 159. – P. 104921.
100. TORC1-dependent epilepsy caused by acute biallelic Tsc1 deletion in adult mice / E. Abs, S.M.I. Goorden, J. Schreiber et al. // *Ann. Neurol.* – 2013. – Vol. 74. – P. 569-579.
101. Z944, a novel selective T-type calcium channel antagonist delays the progression of seizures in the amygdala kindling model / P.M. Casillas-Espinosa, A. Hicks, A. Jeffreys et al. // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10. – P. e0130012.
102. T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures / E. Tringham, K.L. Powell, S.M. Cain et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 4. – P. 121ra19.

103. Expression of microRNA-129-2-3p and microRNA-935 in plasma and brain tissue of human refractory epilepsy / Y. Sun, X. Wang, Z. Wang et al. // *Epilepsy Res.* – 2016. – Vol. 127. – P. 276-283.
104. Inhibition of microRNA-129-2-3p protects against refractory temporal lobe epilepsy by regulating GABRA1 / G.Y. Wang, Z.L. Luan, N.W. Che et al. // *Brain Behav.* – 2021. – Vol. e02195.
105. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects / E.M. Jimenez-Mateos, T. Engel, P. Merino-Serrais et al. // *Nat. Med.* – 2012. – Vol. 18. – P. 1087-1094.
106. Tsankova, N.M. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures / N.M. Tsankova, A. Kumar, E.J. Nestler // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24. – P. 5603-5610.
107. Effects of exercise and pharmacological inhibition of histone deacetylases (HDACs) on epigenetic regulations and gene expressions crucial for neuronal plasticity in the motor cortex / H. Maejima, M. Kitahara, Y. Takamatsu et al. // *Brain Res.* – 2021. – Vol. 1751. – P. 147191.
108. Reddy, S.D. Epigenetic histone deacetylation inhibition prevents the development and persistence of temporal lobe epilepsy / S.D. Reddy, B.L. Clossen, D.S. Reddy // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2018. – Vol. 364. – P. 97-109.
109. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors / S. Eyal, B. Yagen, E. Sobol // *Epilepsia.* – 2004. – Vol. 45. – P. 737-744.
110. Non-histone substrates of histone deacetylases as potential therapeutic targets in epilepsy / S. Kumar, D. Attrish, A. Srivastava et al. // *Expert Opin. Ther. Targets.* – 2021. – Vol. 25. – P. 75-85.
111. FosB mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure / W. Renthal, T.L. Carle, I. Maze et al. // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 28. – P. 7344-7349.
112. FosB regulates gene expression and cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease / B.F. Corbett, J.C. You, X. Zhang et al. // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 20. – P. 344-355.

113. Pingué, V. Post-traumatic seizures and antiepileptic therapy as predictors of the functional outcome in patients with traumatic brain injury / V. Pingué, C. Mele, A. Nardone // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – P. 4708.

114. Two decades of research towards a potential first anti-epileptic drug / S.K. Benassi, J.G.S.M. Alves, C.G. Guidoreni et al. // *Seizure.* – 2021. – Vol. 90. – P. 99-109.

115. Modification of the natural progression of epileptogenesis by means of biperiden in the pilocarpine model of epilepsy / S. Bittencourt, E. Ferrazoli, M.F. Valente et al. // *Epilepsy Res.* – 2017. – Vol. 138. – P. 88-97.

116. Brindley, E. MicroRNAs as biomarkers and treatment targets in status epilepticus / E. Brindley, T.D.M. Hill, D.C. Henshall // *Epilepsy Behav.* – 2019. – Vol. 101. – P. 10672.

117. Способ получения производного 2,6-диметилфенилацетамида, обладающего церебропротекторной активностью: пат. №269506 Рос. Федерация / Е.В. Блинова, Д.С. Блинов, С.Я. Скачилова, Е.В. Семелева, М.М. Гераськина, И.А. Громова; заявитель и патентообладатель – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», заявл. №2018118597 от 21.05.2018, опубликовано 04.06.2019. Бюл. № 16.

118. Environmentally relevant concentrations of carbamazepine caused endocrine-disrupting effects on nontarget organisms / S. Yan, M. Wang, J. Zha et al. // *Chinese Rare Minnows (Gobiocypris rarus)*. *Environ. Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 2. – P. 886-894.

119. Tibbals, J. Acute toxic reaction to carbamazepine: clinical effects and serum concentrations / J. Tibbals // *The Journal of pediatrics.* – 1992. – Vol. 121. – P. 295-299.

120. Арзамасцев, Е.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская, О.Л. Верстакова, Т.А. Гуськова, А.Д. Дурнев и др. / Руководство

по доклиническому изучению лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и Ко, 2012. – С. 13-51.G

121. Identification of novel mutations controlling cerebral cortex malformations caused by ENU-induced mutagenesis in the mouse / E.V. Borisova, E.A. Epifanova, S.A. Tutukova et al. // *Sovremennye tehnologii v medicine*. – 2018. – Vol. 10(3). – P. 70-77

122. Borisova, E.V. ENU-mutagenesis as a tool for identifying novel mouse models of epilepsy / E.V. Borisova, E.A. Turovsky, M.A. Turovskaya et al. // *Opera Med. Physiol.* – 2021. – Vol. 8(1). – P. 5-13.

123. Krushinsky, L.V. Some stages of integration in the formation of behavior in animals / L.V Krushinsky // *Uspekhi sovremennoi biologii*. – 1948. – Vol. 26. – P. 737-754.

124. Anxious Profile Influences Behavioral and Immunohistological Findings in the Pilocarpine Model of Epilepsy / S.R.B. Kohek, M.L. Foresti, M.M. Blanco et al. // *Front. Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – ID640715.

125. Mello, L.E. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures / L.E. Mello, L. Covolan // *Epilepsy Res.* – 1996. – Vol. 26. – P. 123-129.

126. Pellow, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat / S. Pellow, S.E. File // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1986. – Vol. 24. – P. 525-529.

127. Rats with anxious or non-anxious type of exploratory behavior differ in their brain CCK-8 and benzodiazepine receptor characteristics / J. Harro, R.A. Kiivet, A. Lang, E. Vasar // *Behav. Brain Res.* – 1990. – Vol. 39. – P. 63-71.

128. The “anxiety state” and its relation with rat models of memory and habituation / R.L. Ribeiro, R. Andreatini, A. Wolfman et al. // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 1989. – Vol. 72. – P. 78-94.

129. Ho, Y.J. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression / Y.J. Ho, J. Eichendorff, R.K.W. Schwarting // *Behav. Brain Res.* – 2002. – Vol. 136. – P. 1-12. 139

130. Behavioral effects of D-cycloserine in rats: the role of anxiety level / Y.J. Ho, L.S. Hsu, C.F. Wang // *Brain Res.* – 2005. – Vol. 1043. – P. 179-185.
131. Wilson, H.D. The relationship between basal level of anxiety and the affective response to inflammation / H.D. Wilson, J. Boyette-Davis, P.N. Fuchs // *Physiol. Behav.* – 2007. – Vol. 90. – P. 506-511.
132. Walsh, R.N. The open-field test: a critical review / R.N. Walsh, R.A. Cummins // *Psychol. Bull.* – 1976. – Vol. 83. – P. 482-504.
133. Swanson, L.W. Brain maps: structure of the rat brain / L.W. Swanson. - 3rd Ed. Amsterdam: Elsevier. – 2007. – 127 p.
134. Effects of hypoxia-induced neonatal seizures on acute hippocampal injury and later-life seizure susceptibility and anxiety-related behavior in mice / N. Rodriguez-Alvarez, E.M. Jimenez-Mateos, M. Dunleavy et al. // *Neurobiol. Dis.* – 2015. – Vol. 83. – P. 100-114.
135. The selective BDNF overexpression in neurons protects neuroglial networks against OGD and glutamate-induced excitotoxicity / S.G. Gaidin, M.V. Turovskaya, M.S. Gavrish et al. // *Int. J. Neurosci.* – 2020. – Vol. 130. – P. 363-383.
136. BDNF Overexpression Enhances the Preconditioning Effect of Brief Episodes of Hypoxia, Promoting Survival of GABAergic Neurons / M.V. Turovskaya, S.G. Gaidin, M.V. Vedunova et al. // *Neurosci. Bull.* – 2020. – Vol. 36. – P. 733-760.
137. Samini, M. The effect of lithium on acute toxicity of carbamazepine in mice / M. Samini, A.R. Dehpour, K. Hajinabi // *Acta medica Iranica.* – 1997. – Vol. 35. – P. 74-76.
137. 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.
138. 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

139. 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