МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА

«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

Прим. №\_\_\_\_\_

ЖАБОЄДОВА НАТАЛІЯ ВАЛЕРІЇВНА

УДК 615.216.8:617.7-001.3-005.4

**Дисертація**

**ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНА АКТИВНІСТЬ АДЕМОЛУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВНУТРІШНЬОЧЕРЕПНОГО КРОВОВИЛИВУ**

спеціальність 14.03.05 – фармакологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ **Жабоєдова Н. В.**

Науковий керівник: **Волощук Наталія Іванівна,**

доктор медичних наук, професор,

завідувач кафедри фармакології ВНМУ

Київ – 2021

**АНОТАЦІЯ**

*Жабоєдова Н. В.* Церебропротекторна активність адемолу в умовах експериментального внутрішньочерепного крововиливу.– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Вінниця, 2021.

Судинна патологія головного мозку є причиною високого ступеня інвалідизації та показником летальності хворих, переважна більшість котрих представлена працездатним населенням у всьому світі, в тому числі і в Україні. Наявний феномен глутаматноїексайтотоксичністі опосередкований патологічною гіперактивацією NMDA-рецепторів, є тригерним механізмом, ініціація якого представляє перспективний вектор для проведення первинної нейропротекторної терапії. При доклінічній оцінці органопротекторних властивостей одного із похідних адамантану–адемолу - виявлено його модулювальний вплив на поліаміновий сайт NMDA-рецепторів, із швидкою кінетикою «блокади-деблокади». Фармакодинамічне досьє адемолу включає цілу низку активностей, а саме: акто-, кардіо-, нейропротекторну, ноотропну, аналгетичну, антихолінестеразну, гангліоблокуючу, транквілізуючу та антиамнестичну. Експериментальними дослідженнями доведено органопротекторну ефективність адемолу при ішемічних ураженнях головного мозку, серця, зорового аналізатора тощо; узагальнено складові механізми його захисної дії, що включають метаболітотропні властивості та здатність протидіяти деструктивним процесам, таким як апоптоз, некроз, проліферація.

У дисертаційній роботі представлено нове розв’язання актуального завдання фармакології, що полягає у підвищенні ефективності нейропротекції в умовах внутрішньочерепного крововиливу на підставі експериментально обґрунтованої доцільності і можливості застосування за новим призначенням блокатора NMDA рецепторів 1,0 % розчину 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу-гідрохлориду (адемол).

Експерименти виконано на 1144 білих нелінійних статево зрілих щурах-самцях, віком 2,5-3 місяці із середньою масою тіла не менше 160 г (160–180 г). Дотримання етичних норм засвідчено комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (протокол №3 від 25.05.2020).

Порівняльну оцінку впливу промислового зразка 1,0 % розчину адемолу та референс-препаратів на виживаність, неврологічний статус, мнемотропну активність, функціональні показники мікроциркуляції, церебральної та центральної гемодинаміки, коливання внутрішньочерепного тиску (ВМК), біохімічні та морфоцитометричні зміни, проводили в умовах експериментального внутрішньочерепного крововиливу на прикладі внутрішньомозкового та субарахноїдального крововиливу. Перший відтворювали шляхом введення у внутрішню капсулу головного мозку (стереотаксичні координати проекції: Н=7,0 мм, L=3,0 мм, А=1,5 мм від брегми) аутокрові об’ємом 20 мкл/100 г, другий – ін'єкцією через катетер у субарахноїдальний простір (трепанаційний отвір локалізувався у місці аналогічному до попередньої моделі) гепаринізованоїаутокрові в кількості 0,1 мл/кг.

Обидві моделі віддзеркалюють клінічну картину геморагічного інсульту, і є адекватними для доклінічного вивчення потенційних нейропротекторних речовин.

Для первинного скринінгу перспективних нейропротекторів використано модель, що за сукупністю критеріїв: летальність (виживаність), неврологічний дефіцит, нейромаркерна активність, параметри внутрішньочерепного тиску, дає змогу в критичний період інсульту (48 год) залежно від об’єму крові введеній у підпавутинний простір головного мозку щурів, класифікувати крововилив на три ступеня важкості. Встановлено, що субарахноїдальний крововилив (САК) тяжкого, середнього та легкого ступеня важкості, який відтворено при введенні у підпавутинний простір крові об’ємом 0,1; 0,07 та 0,05 мл/кг, відповідно, характеризувався: летальністю тварин (в першому випадку виживаність не більша ніж 30, другому – 70, третьому – 80 %); наростанням активності маркера нейродеструкції NSE в середньому до 4,889±0,139 нг/мл (тяжкий ступінь), 3,313±0,092 нг/мл (середній ступінь), 2,259±0,084 нг/мл (легкий ступінь); зміненим неврологічним статусом (наявний церебральний дефіцит за шкалою С.Р. McGraw 11,93±0,33, 6,53±0,33 та 5,07±0,28 бали); ескалацією параметру внутрішньочерепного тиску до 16,429±0,571, 10,571±0,429 та 7,571±0,369 у.о. відповідно (р<0,05).

На моделі субарахноїдального крововиливу тяжкого ступеня важкості верифіковано умовно-ефективну терапевтичну дозу адемолу на рівні 2 мг/кг довенно, терапія якою сприяла зменшенню: летальності до 10 %, неврологічного дефіциту до 5,73±0,19 бали та падінню значень внутрішньочерепного тиску до 5,714±0,286 од. (р<0,05), виявляючи при цьому мнемотропну активність достеменно кращу за усі референс-препарати.

Щоденне застосування адемолу упродовж 96 год після геморагії в мозок, амортизувала падіння церебральної перфузії, стабілізуючи її рівень на коефіцієнтах мікроциркуляції в корі, котрі виявились вищими за аналогічні у групі контрольної патології в середньому в 3,99 (внутрішньомозкова гематома) та у 7,30 (субрахноїдальний крововилив) рази, що відбувалось на тлі ескалації значень показника об’ємної швидкості церебрального кровоплину в центральній мозковій артерії відносно контролю в середньому на 68,4, р<0,05. При цьому, на відміну від референсногонімодипіну, при довенному застосуванні похідного адамантану, значення центральної гемодинаміки, котрі верифікували за показниками артеріального тиску, тиску в лівому передсерді та рівнем кисню в крові, достеменно не різнились від вихідних, а за ступенем деескалації рівня внутрішньочерепного тиску адемол перевершував ефективність амантадину і магнію сульфату в середньому у 1,85 рази, р<0,05.

За ступенем нейродеструктивних та нейродегенеративних змін при інтракраніальнійгеморагії, котрі ідентифікували за активністю нейрон-специфічної енолази (NSE), адемол вірогідно переважав ефективність німодипіну, амантадину та магнію сульфату в середньому у 1,57, 1,49 та 2,04 рази. Такий процес асоціювався із регресом апоптотичного та проліферативного феномену, виявленого за ступенем фрагментації дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) нейрональнихядер, рівнем білка S100 (S100) і активації синтетичної фази клітинного циклу, переважаючи німодипін в середньому на 13,0 % (апоптоз), та у 1,35 та 1,68 рази (нейропроліферація по титрам S100 і цитометричним показником), р<0,05.

При оцінці масштабу морфо-дегенеративних явищ, які відбуваються в головному мозку при ГІ на тлі церебропротекторної терапії, під час проведенняметоду світлової мікроскопії, було показано, що гістопатологічні зміни при лікуванні церебральної ішемії геморагічного ґенезу адемолом, були помірними із збереженням структурної організації нервової тканини, кори мозку, гіпокампу та елементів мікроциркуляторного русла. При цьому досліджуваний об’єкт мав вигляд за основними оціночними критеріями такими як: наявність/відсутність ядра, ядерця, відростків нейронів та інших структурних клітинних об’єктів, перивазального та навколо клітинного набряку, діапедезу формених елементів крові, цитолізу, а також ознак нейродеструкції стінки, наближався до такого як у псевдооперованих щурів, що відповідало фактам, які було отримано при імуноферментному досліджені нейроспецифічних ферментів.

Серед патобіохімічних складових нейропротекторної дії адемолу при геморагічному ураженні головного мозку зареєстрована його здатність зменшувати формування глутаматної та стероїдної ексайтотоксичності. В групі тварин, які отримували адемол, рівень глутамату в мозку щурів з внутрішньомозковимкрововиливом становив 16,3±0,32 нмоль/мг протеїну, що в 1,93 рази менше, ніж у тварин контрольної патології. На тлі дії німодипінуантиексайтотксична дія була незначно більшою, ніж у адемолу (рівень глутамату становив 14,75±0,27 нмоль/мг протеїну), однак відмінності між німодипіном та адемолом не сягали статистично вірогідних значень. Амантадин та магнію сульфат в меншій мірі попереджали збільшення глутамату в головному мозку щурів з ВМК. Цей показник склав відповідно 17,7±0,39 та 22,0±0,42 нмоль/мг протеїну. За антиексайтотоксичним ефектом при ВМК адемол в дозі 2 мг/кг в/в та німодипін і амантадину сульфат виявились співставними, а магнію сульфат їм статистично (p<0,05) поступався.

Щурам з ВМК проводили лікувальну курсову інфузіюадемолу умовно-ефективною дозою 2 мг/кг в/в, що достовірно ліпше протидіяло наростанню глюкокортикоїдноїнейротоксичностіза решту референсів. Це проявилось у помірному підвищенню рівня кортизолу відносно псевдооперованих тварин, у той час, як на тлі препаратів-порівняння наростання кортизолу виявилось значно вищим. Так, наприкінці експериментальної терапії інсульту адемолом, вміст досліджуваного гормону в сироватці крові сагітального синуса зменшився відносно групи контрольної патології в середньому у 3,22 рази (р<0,05). Такий фармакодинамічнийефект адемолу свідчить про наявність у нього позитивного модулювального впливу на формування стероїдної нейротоксичності. Заздатністю знижувати вміст досліджуваного гормону в умовах ВМК,інфузіяадемолу по ефективності значно переважала німодипін в середньому в 1,51, а амантадину та магнію сульфату відповідно у 1,97 і 2,63 рази.

До механізмів церебропротекторної активності адемолу при інтракраніальнійгеморагії, окрім спроможності препарату покращувати мозковий кровоплин, знижувати підвищений внутрішньочерепний тиск, послаблювати явище нейроцитолізу, апоптозу, проліферації, глутаматної та стероїдної нейротоксичності відносяться його можливість (на прикладі гострого періоду субарахноїдального крововиливу) ліквідувати енергодефіцит мозку (збільшення вмісту в мозку аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ), пірувату та покращення енергетичного заряду відносно зразків контрольної патології в середньому відповідно на 45,1, 42,9 та 22,0 %, р<0,05); зменшувати лактат-ацидоз (зменшення вмісту лактату на 31,9 %, р<0,05), впливати на оксидативний стрес (зниження рівня малонового діальдегіду (МДА) та карбонільних груп протеїнів (КГП) в середньому на 30,5 та 18,8 %, на тлі зростання активності супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) і каталази відповідно на 42,1, 25,2 та 37,6 %, р<0,05), модулювати обмін монооксиду азоту (підвищення активності NO-синтази при паралельному збільшенні вмісту донатора NO L-аргініну в середньому відповідно на 14,0 та 44,0 %, р<0,05). За перерахованими властивостями адемол достовірно переважав однойменні ефекти у німодипіну, амантадину та магнію сульфату.

**Ключові слова:**адемол, NMDA-рецептори, внутрішньочерепний крововилив, субарахноїдальний, внутрішньомозковий крововилив, церебропротекція, німодипін, амантадину сульфат, магнію сульфат.

**SUMMARY**

*Zhaboiedova N. V.* Cerebroprotective activity of ademol in the conditions of experimental intracranial hemorrhage. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of medical sciences on a specialty 14.03.05 – pharmacology. - Vinnytsia Pirogov Memorial National Medical University, Vinnytsia, 2021.

Vascular pathology of the brain is the cause of a high degree of disability and mortality rate of patients, the vast majority of whom are the workable population around the world, including Ukraine. The existing phenomenon of glutamate excitotoxicity is mediated by pathological hyperactivation of NMDA receptors. It is a trigger mechanism, the initiation of which is a promising vector in the direction of which it is advisable to implement primary neuroprotective therapy. In the preclinical evaluation of the organ protective properties of one of the derivatives of adamantane – ademol, a modulating effect was revealed on the polyamine site of NMDA receptors with rapid kinetics of "blockade-deblockade". Pharmacodynamic dossier of ademol has some activities, namely: acto-, cardio-, neuroprotective, nootropic, analgesic, anticholinesterase, ganglion blocking, tranquilizing and antiamnestic. Experimental studies have proven the organ protective efficacy of ademol in ischemic lesions of the brain, heart, etc. The components of the mechanism of its protective action were summarized, including metabolic-otropic properties and the ability to counteract destructive processes, such as apoptosis, necrosis, proliferation.

The dissertation presents a new solution to the current problem of pharmacology, which is to increase the effectiveness of neuroprotection in intracranial hemorrhage based on experimentally justified feasibility and the possibility of using according to the new administration of NMDA receptor blocker of 1.0% solution of 1-adamantylthyloxy-3-morpholino-2 -propanol hydrochloride (ademol).

The experiments were performed on 1144 white nonlinear sexually mature male rats, aged 2.5-3 months, and with an average body weight of at least 160 g (160-180 g). Compliance with ethical standards is certified by the Committee on Bioethics of Vinnytsia Pirogov Memorial National Medical University (protocol №3 from 25.05.2020).

Comparative assessments of the effect of an industrial sample of 1.0% ademol solution and reference-drugs on survival, neurological status, mnemotropic activity, functional indicators of microcirculation, cerebral and central hemodynamics, fluctuations in intracranial pressure (ICP), biochemical and morphocytometric changes were performed under the conditions of experimental hemorrhagic stroke on examples of intracerebral and subarachnoid hemorrhage. The first was reproduced by introducing into the inner capsule of the brain (stereotactic projection coordinates: H = 7.0 mm, L = 3.0 mm, A = 1.5 mm from the bregma) of auto blood, the volume is 20 μl/100 g. The second was reproduced by injection of heparinized autologous blood in the amount of 0.1 ml/kg through a catheter into the subarachnoid space (trepanation hole was located in a place similar to the previous model).

Both models reflect the clinical picture of hemorrhagic stroke and are adequate for preclinical studies of potential neuroprotective substances.

A model was used for the primary screening of promising neuroprotectors. According to a set of criteria (mortality (survival), neurological deficiency, neuro- markers activity, intracranial pressure parameters), it allows classifying hemorrhage into three degrees of severity in the critical period of stroke (48 h) depending on the volume of blood injected into rats’ subarachnoid brain. It has been established that subarachnoid hemorrhage (SAH) of severe, moderate, and mild severity, which is reproduced when blood is injected into the subarachnoid space with a volume of not less than 0.1; 0.07 and 0.05 ml/kg, respectively, was characterized by the mortality of animals (in the first case, the survival rate was not more than 30%, in the second case it was 70%, and in the third case - 80%); an increase in the activity of neuron destruction marker of NSE on average to 4.889 ± 0.139 ng/ml (severe stroke), 3.313 ± 0.092 ng/ml (moderate), 2.259 ± 0.084 ng/ml (mild); altered neurological status (existing cerebral deficiency on C. P. McGraw scale was 11.93 ± 0.33, 6.53 ± 0.33 and 5.07 ± 0.28 points according to the amount of blood); escalation of the intracranial pressure parameter to 16.429 ± 0.571, 10.571 ± 0.429 and 7.571 ± 0.369 USD respectively (p <0,05).

In a model of severe subarachnoid hemorrhage, a conditionally effective therapeutic dose of ademol at the level of 2 mg/kg was verified, the therapy of which helped to reduce the following data: mortality to 10%, neurological deficiency to 5.73 ± 0.19 points, and a drop in intracranial pressure to 5.7 ± 0.286 units (p <0.05), showing mnemotropic activity significantly better than all reference-drugs.

Daily use of ademol for 96 h after hemorrhage in the brain, amortized the drop in cerebral perfusion, stabilizing its level on the coefficients of microcirculation in the cortex, which were higher than similar in the control group on average by 3.99 (intracerebral hematoma) and 7.3 (subarachnoid hemorrhages) times. That occurred against the background of escalation of the values ​​of the cerebral blood flow volume rate in the central cerebral artery relative to the control on average by 68.4, p <0.05. In contrast to the reference nimodipine, in the case of pre-administration of the adamantane derivative, the values ​​of central hemodynamics, which were verified by blood pressure, left atrial pressure, and blood oxygen saturation did not differ significantly from baseline. For the degree of de-escalation of the level of intracranial pressure ademol exceeded the efficiency of amantadine and magnesium sulfate on average 1.85 times, p <0.05.

According to the degree of neurodestructive and neurodegenerative changes in intracranial hemorrhage, which were identified by the activity of neuron-specific enolase (NSE), ademol probably exceeded the effectiveness of nimodipine, amantadine, and magnesium sulfate by an average of 1.57, 1.49, and 2.04 times. This process was associated with regression of the apoptotic and proliferative phenomenon detected by the degree of deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation of neuronal nuclei, the level of S100 protein (S100), and the activation of the synthetic phase of the cell cycle, exceeding nimodipine on average by 13.0%, and 1.35 and 1.68 times (neuron proliferation by S100 titers and cytometric index), p <0.05.

When assessing the scale of morpho-degenerative phenomena occurring in the brain by HI on the background of cerebroprotective therapy, which was performed using light microscopy, it was shown that histopathological changes in the treatment of cerebral ischemia of hemorrhagic genesis by ademol were moderate with preservation of structural tissue, cerebral cortex, hippocampus and elements of the microcirculatory tract. According to the main descriptive evaluation criteria (presence/absence: nucleus, nucleolus, processes of neurons and other structural cell objects, perivasal and around cell edema, diapedesis of blood cells, cytolysis, signs of neuron destruction of the wall), the panoramic view of the object had a view that approached that of sham-operated rats, which corresponded to the facts obtained by enzyme-linked immunosorbent assay of neuro specific enzymes.

The ability to reduce the formation of glutamate and steroid excitotoxicity has been registered among the pathobiochemical components of the neuroprotective action of ademol in hemorrhagic brain damage. In the group of animals treated with ademol, the level of glutamate in the brain of rats with intracerebral hemorrhage was 16.3 ± 0.32 nmol/mg of protein, which is 1.93 times less than in animals of control pathology. Against the background of nimodipine, the antiexitotic effect was slightly higher than that of ademol (glutamate level was 14.75 ± 0.27 nmol/mg protein), but the differences between nimodipine and ademol did not reach statistically significant values. Amantadine and magnesium sulfate were less likely to prevent an increase of glutamate in the brains of ICH rats: 17.7 ± 0.39 and 22.0 ± 0.42 nmol/mg protein, respectively. Ademol at a dose of 2 mg/kg iv and nimodipine and amantadine sulfate were comparable in terms of antiexcitotoxic effect in ICH, and magnesium sulfate was statistically (p <0.05) inferior to them.

Therapeutic course infusion of ademol at a conditionally effective dose of 2 mg/kg iv in rats with ICH, significantly better than the rest of the references, predicted the increase of glucocorticoid neurotoxicity, which was manifested in a moderate increase of cortisol levels in sham-operated animals. At the same time, against the background of drugs-comparison, the increase in cortisol was much higher (at times). Thus, at the end of the experimental therapy of stroke with ademol, the content of the studied hormone in the serum of the sagittal sinus decreased relative to the control pathology group by an average of 3.22 times (p <0.05). This pharmacodynamic effect of ademol indicates that it has a positive modulating effect on the formation of steroid neurotoxicity. At the same time, in the conditions of ICH, infusion of ademol on the ability to reduce the content of the studied hormone, probably outperformed nimodipine by an average of 1.51 times, and amantadine and magnesium sulfate, respectively, 1.97 and 2.63 times.

The mechanisms of cerebroprotective activity of ademol in intracranial hemorrhage, in addition to the ability of the drug to improve cerebral blood flow, reduce elevated intracranial pressure, reduce the phenomenon of neurocytolysis, apoptosis, proliferation, glutamate and steroid neurotoxicity, may include the ability (on the example of an acute period of subarachnoid hemorrhage) to eliminate energy deficiency of the brain (increase in the content of adenosine triphosphate (ATP) in the brain), to improve the energy charge relative to the samples of control pathology by an average of 45.1, 42.9 and 22.0%, respectively, p <0.05); to reduce lactic acidosis (decrease in lactate content by 31.9%, p <0.05), to affect oxidative stress (decrease in the level of malonic dialdehyde (MDA) and carbonyl groups of proteins (CGP) by an average of 30.5 and 18.8 %, against the background of increasing activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPO) and catalase, respectively, 42.1, 25.2 and 37.6%, p <0.05), to modulate the metabolism of nitric oxide (increase in NO synthase activity in parallel increase in the content of the donor NO L-arginine on average by 14.0 and 44.0%, respectively, p <0,05). In terms of these properties, ademol significantly exceeded the beforementioned effects of nimodipine, amantadine, and magnesium sulfate.

**Key words:** ademol, NMDA receptors, intracranial hemorrhage, subarachnoid, intracerebral hemorrhage, cerebroprotection, nimodipine, amantadine sulfate, magnesium sulfate.

**СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Жабоєдова Н. В., Загорій Г. В., Ходаківський О. А. Скринінг церебропротекторних властивостей промислового зразка ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемол") на моделях гострого порушення мозкового кровообігу за геморагічним типом. Вісник морфології. 2016. Т. 22, № 1. С. 71–77. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних джерел, відтворенняя модельної патології, виконання запланованих скринінгових досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка, оформлення та подача статті до друку).*
2. Порівняльна оцінка впливу адемолу та німодипіну на церебральну гемодинаміку в корі головного мозку за умов експериментального субарахноїдального крововиливу / О. А. Ходаківський та ін. Світ медицини та біології. 2016. Т. 57, № 3. С.150–153. *(Особистий внесок: відтворення модельної патології, проведення доплерографічних досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка та переклад резюме, оформлення і подача до друку статті).*
3. Жабоєдова Н. В. Характеристика показників центральної гемодинаміки, внутрішньочерепного тиску та мікроциркуляції в капілярах кори головного мозку у щурів із різними підтипами геморагічного інсульту та тлі інфузії розчинів Адемолу або німодиіну. Biomedicaland вiosocialanthropology*.* 2016. Vol. 27. Р. 62–67.
4. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Дослідження метаболічних процесів у головному мозку за умов геморагічного інсульту на тлі фармакотерапії адемолом. Вісник Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. 2019. № 3 (23). С. 360–367. *(Особистий внесок: опрацювання літературних джерел, моделювання геморагічного інсульту, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, формування висновків та узагальнення, підготовка, оформлення та подача тез до друку).*
5. Voloshchuk N., Zhaboiedova N. Evaluationofthecerebroprotectiveactionof 1-adamantyloxy-3morpholino-2-propanol hydrochlorideinratswithexperimentalhemorrhagicstrokeaccording to thedynamicsofneurocytolysis, neuroapoptosisandneuroproliferationmarkers. BiologicalMarker. 2020. Vol. 4, № 2. P. 13–19. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних джерел, відтворення геморагічного інсульту, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, формування висновків та узагальнення, підготовка, оформлення та подача тез до друку).*
6. Оцінка ефективності експериментальної терапії геморагічного інсульту промисловим зразком ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемол") за активністю маркера нейродеструкції нейрон-специфічної енолази / Н. В. Жабоєдова и др. Фармація XXI століття: тенденції та перспективи: матеріали VІІІ Національного з’їзду фармацевтів України (м. Харків, 13–16 вересня 2016 р.): у 2 т. Т. 2 // Міністерство охорони здоров'я України, Національний фармацевтичний університет; ред. кол.: В. П. Черних (голова) та ін.; уклад.: С. Ю. Данильченко та ін. Харків; НФаУ, 2016. С. 120–121.
7. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка церебропротекторної дії промислового зразка ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемол"), амантадину та магнію сульфату при субарахноїдальному крововиливі у щурів за активністю нейрон-специфічної енолази. *Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології:* тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, пам’яті проф. В. В. Дунаєва (Запоріжжя, 24–25 листопада 2016 р.).Запоріжжя: Запоріжський ДМУ, 2016. С. 43.
8. Застосування комплексного патогенетично-обґрунтованого підходу до вивчення ефективності потенційних цитопротекторів при ішеміко-гіпоксичному, токсичному або травматичному ураженні серця, печінки, нирок, органа зору, центральної та периферичної нервової системи (нерви щелепно-лицьової ділянки, тощо) / Ходаківський О. А. та ін. Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України: матеріали ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (Вінниця, 16–17 листопада 2017 р.). Вінниця: Нілан-ЛТД, 2017. С. 269–273.
9. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Дослідження неврологічного дефіциту у щурів із геморагічним інсультом на тлі терапії адемолом та оцінка його мнемотропної активності. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція: матеріали І науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю (18 жовтня 2018 р.). Х.: НФаУ, 2018.С. 90–91.
10. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Оцінка імуноферментрних та протоково-цитометричних маркерів церебропротекторної дії адемолу в умовах експериментального геморагічного інсульту за активністю процесів нейроцитолізу, нейроапоптозу та нейропроліферації. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція:тези доповідей ІІ науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю (Харків, 21 листопада 2019 р.). Х.: НФаУ, 2019. С. 153–154.
11. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Характеристика моделі геморагічного інсульту на прикладі доклінічної оцінки нейропротекторних властивостей адемолу.Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України*:* матеріали Х Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (Вінниця, 7–8 листопада 2019 р.). Вінниця: ТОВ «ТВОРИ», 2019.С. 68–70.
12. Жабоєдова Н. В. Оцінка церебропротекторної активності адемолу в умовах геморагічного інсульту у щурів. Перший крок в науку – 2020: тези доповідей XVII науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю (Вінниця, 8–10 квітня 2020 р.). Вінниця: ФОП Корзун Д.Ю., 2019. С. 487.

# ЗМІСТ

|  |  |
| --- | --- |
| АНОТАЦІЯ…………………………………………………………………….. | 2 |
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ………………………………………… | 18 |
| ВСТУП………………………………………………………………………….. | 20 |
| РОЗДІЛ 1. ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ФООРМУВАННЯ ІШЕМІЧНОГО ВОГНИЩА ПРИ ІНТРАЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ГЕМОРАГІЇ. НАПРЯМКИ, МОЖЛИВОСТІ ТА ЗАСАДИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЇ ТЕРАПІЇ ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ (огляд літератури)…………………. | 26 |
| * 1. Особливості формування провідних ланок патобіохімічного каскаду в нейронах при інтракраніальному крововиливі поліетіологічної природи (субарахноїдальний та внутрішньочерепний крововилив, черепно-мозкова травма)…………………………………………………………………….…. | 26 |
| * 1. Програма цитопротекторної терапії (у т.ч. нейропротективної) в Україні та за кордоном: здобутки, недоліки та новітні напрями розвитку……. | 30 |
| * 1. Проблеми адекватності моделей церебральної гострої ішеміїпотипу внутрішньочерепного крововиливу аналогічній клінічній патології у людини……………………………………………………………………………… | 35 |
| * 1. Доцільність доклінічної оцінки блокаторів різних сайтів NMDA-рецепторів, як перспективних нейропротекторів при деструктивних захворюваннях мозку ішемічної та геморагічної природи……………………… | 37 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ………… | 44 |
| 2.1. Опис дослідних тварин та умови їх утримання……………………………. | 44 |
| 2.2. Відтворення моделей інтракраніальноїгеморагії: відтворення субарахноїдального та внутрішньомозкового крововиливу. Методологія оцінки виживаності тварин, неврологічного статусу, мнемотропної активності та показників вітальних функціональних параметрів…………………………… | 47 |
| 2.3. Вибір, аналіз та обгрунтуваннядозового режиму та схем введення лікарських засобів нейропротекторної природи (адемолу та референс-препаратів)………………………………………………………………………….. | 50 |
| 2.4. Загальна характеристика біохімічних, цитометричних та морфологічних (гістологічних) методів дослідження……………………………………………... | 56 |
| 2.5. Методи статистичного аналізу…………………………………………… | 58 |
| РОЗДІЛ 3. СКРИНІНГ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ АДЕМОЛУ В УМОВАХ РІЗНИХ ПІДТИПІВ ВНУТРІШНЬОЧЕРЕПНОГО КРОВОВИЛИВУ………………………………………………………………….. | 60 |
| 3.1. Апробація моделі субарахноїдального крововиливу у щурів, викликаного введенням у підпавутинний простір м'якої мозкової оболонки аутокрові для доклінічної оцінки потенційних церебропротекторів…………... | 60 |
| 3.2. Вплив адемолу на виживаність щурів із модельним внутрішньочерепним крововиливом…..………………………………………… | 67 |
| 3.3. Дослідження неврологічного дефіциту у щурів із гострим порушенням мозкового кровообігу за геморагічним типом під впливом адемолу та референс-препаратів із подальшою оцінкою його мнемотропної активності…. | 75 |
| РОЗДІЛ 4. ОЦІНКА ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ АДЕМОЛУ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ЕЛЕКРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН………………………………………………………………………………... | 82 |
| 4.1. Динаміка змін параметру об’ємної швидкості мозкового кровотоку в центральній мозковій артерії у щурів із субарахноїдальним крововиливом на тлі інфузії розчинів адемолу або німодипіну…………………………………….. | 82 |
| 4.2. Характеристика показників мікроциркуляції в капілярах кори головного мозку щурів та центральної гемодинаміки у тварин із різними підтипами внутрішньочерепного крововиливу на тлі інфузії розчинів адемолу або німодипіну……………………………………………………………………... | 84 |
| РОЗДІЛ 5. МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ ІНТРАКРАНІАЛЬНИМ КРОВОВИЛИВОМ НА ТЛІ ТЕРАПІЇ АДЕМОЛОМ ЗА ЙОГО ВПЛИВОМ НА ПРОЦЕСИ НЕЙРОЦИТОЛІЗУ, НЕЙРОАПОПТОЗУ, НЕЙРОПРОЛІФЕРАЦІЇ …………………………………. | 93 |
| 5.1. Вплив адемолу та референс-препаратів на динаміку нейроцитолізу у головному мозку щурів із внутрішньочерепним крововиливом за активністю нейрон-специфічної енолази……………………………………………………… | 93 |
| 5.2. Інтенсивність нейроапоптозу при експериментальному внутрішньомозковому крововиливі на тлі терапії адемолом…………………… | 96 |
| 5.3. Дія адемолу та референс-препаратів на активність нейропроліферативних процесів у головному мозку щурів із внутрішньомозковим крововиливом за рівнем білка S100 та даними протоково-цитометричного аналізу………………………………………………. | 100 |
| 5.4. Оцінка впливу адемолу на морфо-деструктивні зміни у головному мозку щурів з інтракраніальним крововиливом за даними світлової мікроскопії………………………………………………………………………… | 103 |
| РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ВНУТРІШНЬОНЕЙРОНАЛЬНИХ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ НА ТЛІ ТЕРАПІЇ АДЕМОЛОМ………………. | 110 |
| 6.1. Зміни пулу макроергів та інтермедіатів вуглеводного обміну в головному мозку щурів із субарахноїдальним крововиливом при терапії адемолом……………………………………………………………………………. | 110 |
| 6.2. Вплив адемолу на перебіг оксидативного стресу та обмін монооксиду азоту в головному мозку щурів із субарахноїдальним крововиливом ………... | 114 |
| 6.3. Вплив адемолу та референс-препаратів на формування глутаматної та стероїдної нейротоксичності у щурів із внутрішньомозковим крововиливом………………………………………………………………………. | 120 |
| РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ. | 126 |
| ВИСНОВКИ……………………………………………………………………. | 142 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……………………………………… | 145 |
| ДОДАТКИ……………………………………………………………………… | 165 |

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

|  |  |
| --- | --- |
| АДФ | –аденозиндиифосфорна кислота |
| АМФ | –аденозинмонофосфорна кислота |
| АТ | –артеріальний тиск |
| АТФ | –аденозинтрифосфорна кислота |
| в/в | – внутрішньовенно |
| в/о | – внутрішньоочеревинно |
| в/ш | – внутрішньошлунково |
| ВМК | – внутрішньомозковий крововилив |
| ВНМУ | – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова |
| ВЧК | –внутрішньочерепний крововилив |
| ВЧТ | –внутрішньочерепний тиск |
| ГЕБ | –гематоенцефалічний бар'єр |
| ГІ | – геморагічний інсульт |
| ГПО | –глутатіонпероксидаза |
| гпмк | – гостре порушення мозкового кровотоку |
| ДНК | –дезоксирибонуклеїнова кислота |
| ІІ | – ішемічний інсульт |
| ІР | – ішемія / реперфузія |
| КГП | – карбонільні групи протеїнів |
| МДА | –малоновий діальдегід |
| МОЗ | –Міністерство охорони здоров’я |
| ННДЛ | – навчально-науково-дослідна лабораторія |
| ОШМК | –об'ємна швидкість мозкового кровотоку |
| ПОЛ | – перекисне окиснення ліпідів |
| САК | –субарахноїдальний крововилив |
| САП | –субарахноїдальний простір |
| СМА | – середня мозкова артерія |
| СОД | – супероксиддисмутаза |
| ЦВТ | – центральний венозний тиск |
| ЦД | – цукровий діабет |
| ЦНС | – центральна нервова система |
| ЧМТ | – черепно-мозкова травма |
| Log P | –логарифм Р |
| NMDA | –N-метил D-аспартат |
| NО | –нітроген монооксид (оксид азоту) 1 раз |
| NSE | –нейронспецифічнаенолаза |
| SaO2 | – ступінь насичення крові киснем |
| S100 | –білок S100 |

**ВСТУП**

**Обґрунтування вибору теми дослідження**

Головний мозок як невід’ємна морфо-функціональна складова ЦНС, являє собою її провідну мішень, а закономірні нейросудинні зміни корелюють із високим ступенем інвалідизації та показником летальності хворих, переважна більшість котрих пред-ставлена працездатним населенням України [1–4]. Наявний феномен глутаматноїексайтотоксичністі, опосередкований патологічною гіперактивацією NMDA – рецепторів, є тригерним механізмом, ініціація якого представляє перспективний вектор для впровадження первинної нейропротекторної терапії [5–8]. При доклінічній оцінці органопротективних властивостей одного із похідних адамантану–адемолу з’ясовано, що він проявляє модулювальний вплив на поліаміновий сайт NMDA-рецепторів і є їх неповним блокатором із швидкою кіне-тикою «блокади-деблокади». Окрім цього, адемол як антагоніст β-адрено-рецепторів, володіє утеростимулювальним ефектом, що і стало підґрунтям для його впровадження в якості лікарського засобу, що позитивно впливає на скоротливу спроможність матки у породіль.

Пізніше, фармакодинамічне досьє адемолу розширилось завдяки відкриттю нових видів активності, а саме акто-, кардіо-, нейропротекторної,ноотропної, аналгетичної, антихолінестеразної, гангліоблокуючої, транквілізуючої та антиамнестичної [10–16].Узагальнено складові механізму його захисної дії при ішемічному інсульті (ІІ), гіпоксичних станах різного ґенезу, інфаркті міокарда, черепно-мозковій травмі (ЧМТ) та перехідній ішемії (ІР) зорового аналізатора, пов’язано із притаманною для похідного адамантану коригувальною дією на порушений внутрішньоклітинний гомеостаз метаболічного характеру (енергетичний, вуглеводний, оксидантно-антиоксидантний баланс, обмін монооксиду азоту, нітрозативний стрес, ацидотичний стан) та деструктивні процеси, такі як апоптоз, некроз, проліферація.

Наведені дані притаманної адемолунейропротективної активності в умовах ішемічно-гіпоксичного ураження нервової тканини (ІІ), дають підґрунтя та роблять доцільним вивчення аналогічних ефектів у цього препарату і при САК та ВМК.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Робота виконана в межах спільно запланованої науково-дослідної тематики ННДЛ «Фармадар», кафедри фармакології, біологічної та загальної хімії Міністерства охорони здоров’я (МОЗ) України «Доклінічна оцінка перспективних органопротекторів», № державної реєстрації 00115U007126; загальної університетської науково-дослідної тематики при кафедрі фармакології «Пошук та розробка нових шляхів фармакологічної корекції порушень при ішемічному ушкодженні мозку та серця в експерименті», № державної реєстрації 0112U0021939 (пошукач є співвиконавцем обох науковий тематик).

**Мета і завдання дослідження**

**Мета дослідження** – експериментально обґрунтувати можливість підвищення ефективності нейропротекції в умовах внутрішньочерепного крововиливу шляхом застосування за новим призначенням розчину блокатора NMDA рецепторів адемолу (1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду).

**Завдання дослідження:**

1. Провести скринінгові дослідження церебропротекторної активності промислового зразка 1,0 % розчину 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду, німодипіну, магнію сульфату та амантадину сульфату на моделях субарахноідального та внутрішньомозкового крововиливу у щурів із паралельною оцінкою ступеня важкості субарахноїдального крововиливу в залежності від об’єму крові, введеній у підпавутинний простір.
2. Встановити умовно-ефективну органопротекторну дозу адемолу на моделях субарахноїдального (САК) та внутрішньомозкового (ВМК) крововиливів і визначити перспективність її подальшої доклінічної оцінки порівняно з референс-препаратами.
3. Оцінити вплив адемолу за умов субарахноїдального та внутрішньомозкового крововиливів на динаміку неврологічного дефіциту та мнемотропну активність щурів.
4. Вивчити вплив адемолу на церебральну і системну гемодинаміку та зміни внутрішньочерепного тиску на моделях внутіршньочерепного крововиливу у щурів.
5. На тлі експериментального внутрішньочерепного крововиливу оцінити зміни гістологічної будови мозку, а також охарактеризувати морфологічні маркери церебропротекторної дії адемолу - процеси нейроцитолізу, нейроапоптозу та нейропроліферації.
6. З’ясувати внутрішньоклітинні метаболітотропні механізми церебропротекторної дії адемолу за критеріями впливу на енергетичний метаболізм, оксидантно-антиоксидантний баланс, обмін монооксиду азоту та формування глутаматної та стероїдної нейротоксичності в головному мозку щурів за експериментального внутрішньочерепного крововиливу.

*Об’єкт дослідження:*фармакологічна корекція уражень головного мозку за внурішньочерепного крововиливу.

*Предмет дослідження:*церебропротекторні властивості адемолу на моделях експериментальної субарахнїдальної та внутрішньомозковоїгеморагії

**Наукова новизна одержаних результатів**

Уперше надано оцінку ефективності промислового зразка адемолу у вигляді розчину за новим призначенням, а саме як нейропротекторного засобу при експериментальному внутрішньомозковому крововиливі різної локалізації – субарахноїдальному та внутрішньомозковому.

Вперше на доклінічному етапі із використанням специфічних чутливих сироваткових маркерів, що віддзеркалюють морфологічну цілісність нейронів, встановлено умовно-ефективну нейропротекторну дозу адемолу в умовах внутрішньочерепного крововиливу, яка становила 2 мг/кг.

Вперше охарактеризовано механізми церебропротекторної дії адемолу при крововиливі у мозок, які окрім спроможності препарату послаблювати процеси нейроцитолізу, нейроапоптозу та нейропроліферації, ґрунтуються на його здатності покращувати церебральну перфузію, знижувати ВЧТ, прояви глутаматної та стероїдної нейротоксичності, ліквідувати енергодефіцит мозку, оксидативний та нітрозативний стрес, зменшувати лактат-ацидоз.

Отримані в роботі результати щодо фармакодинамікиадемолу за умов внутрішньочерепного крововиливу доповнюють наукові дані про ефективність препарату за умов ішемічних уражень головного мозку, що є теоретичним підгрунтям для подальших клінічних досліджень адемолу в якості церебропротекторного засобу на етапі недиференційованого лікування судинних мозкових катастроф.

**Практичне значення одержаних результатів**

Поглиблено існуючі уявлення про фармакодинамікуадемолу, експериментально доведено можливість корекції нейродеструктивних змін при внутрішньочерепній геморагії за допомогою інгібітораполіамінового сайту адемолу. Розширено теоретичні уявлення про діагностичну роль таких сироваткових нейромаркерів як NSE та білок S100 для експрес діагностики наявності та масштабу деструктивно-дегенеративних змін у мозку при геморагічному інсульті.

На базі потужностей ПрАТ Фармацевтична фірма «Дарниця», згідно результатів, що були отримані пошукачем у ході доклінічних досліджень в рамках її дисертаційної роботи, виконується практичне впровадження цього лікарського засобу в якості церебропротектора у вигляді 1,0% розчину (наказ по ПрАТ Фармацевтична фірма «Дарниця» від 14.12.2017 р. № 1217/14-01).

Результати впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри клінічної фармакологіїта клінічної фармаціїНаціонального фармацевтичного університету, кафедри біохімії та медичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедри фармакології Одеського національного медичного університету, кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, навчальному та лікувально-діагностичному процесі кафедри офтальмології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупіка.

**Особистий внесок здобувача**

Здобувачка особисто виконала патентно-інформаційний пошук, здійснила огляд літературних джерел за темою наукового дослідження, сумісно із науковим керівником намітила та охарактеризувала мету й задачі, обрала методики дослідження. Опанувала загальноприйняті моделі по відтворенню геморагічного ураження мозку, у співавторстві апробувала модель інтракраніального крововиливу, засвоїла методики фармакологічних, біохімічних, функціональних та цитометричних досліджень, після чого самостійно провела дослідну частину роботи., виконала статистичну обробку цифрових даних, підготувала розділи дисертації, у т.ч. частину, присвячену узагальнню та обговоренню отриманого фактичного матеріалу,окреслила висновки та підготувала публікації.

Автор висловлює подяку за консультативну допомогу співробітникам ВНМУ МОЗУкраїни: д. мед. н., проф. кафедри фармакології О. АХодаківському при проведенні фармакологічних експериментів, д. мед. н., проф. кафедри біологічної та загальної хіміїА. В. Мельнику при проведенні біохімічних досліджень, к. мед. н., ст. н. с., доц. кафедри очних хвороб І. Л. Черешнюку при здійсненні протоково-цитометричного аналізу головного мозку на базі науково-дослідного центру, співробітникам ННДЛ «Фармадар» при оцінці функціональних показників.

**Апробація результатів дисертації**

Головний зміст наукового дослідження оприлюднено на VІІІНаціональному з’їзді фармацевтів України (Харків, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, пам’яті професора В. В. Дунаєва (Запоріжжя, 2016); V Національному з’їзді фармакологів України(Запоріжжя, 2017); ІХ та ХВсеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні ас-пекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України» (Він-ниця, 2017, 2019); І та ІІ Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю (Харків, 2018, 2019), ХVIІ Науково-практичній конференції студентів та мо-лодих вчених з міжнародною участю «Перший крок в науку – 2020» (Вінниця, 2020).

**Впровадження результатів дослідження в практику**

Результати впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри клінічної фармакологіїта клінічної фармаціїНаціонального фармацевтичного університету, кафедри біохімії та медичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедри фармакології Одеського національного медичного університету, кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, навчальному та лікувально-діагностичному процесі кафедри офтальмології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупіка.

**Методи дослідження**

Фармакологічні (фармакодинамічні методи оцінки нових видів активності, методики модулювання патологічних станів ВЧК; біохімічні (спектрофотометричний аналіз, метод тонкошарової хроматографії, методики верифікації феномену глутаматноїексайтотоксичності, оцінки енергетичного балансу, вивчення обміну монооксиду азоту, дослідження явищ перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), нітрозативного стресу і активності антиоксидантної системи; імуноферментні методи з визначення стероїдної нейроксичності, активності NSE, рівня S100); цитологічні (протоково-цитометричний аналіз із визначенням маркера нейроапоптозуфрагментованої ядерної ДНК та нейрогліопроліферативної активності за фазою S клітинного циклу), функціональні (вимірювання ВЧТ тонометром ICARE, лазердоплерографіяінтра- та екстракраніальних судин, оцінка гемодинамічних параметрів модулем BIOPAK), статистичні (параметричний критерій t Ст’юдента, непараметричний критерій W. Уайта, парний критерій Ť Вілкоксона – для визначення значущих змін у динаміці всередині групи, кутове перетворення Фішера – при обліку результатів в альтернативній формі).

**Публікації.** За темою дисертаційної роботи опубліковано 12 робіт, у тому числі 5 статей у фахових журналах, рекомендованих МОН України (1 публікація в науковому періодичному міжнародному виданні) та 7 тез-доповідей у матеріалах з’їздів та конференцій.

**Структура і обсяг дисертації**

Дисертація викладена на 164 сторінках друкованого тексту (основна текстова частина – 116 сторінки) і включає анотацію, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, 4 розділи власних досліджень, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних джерел, що включає 197 найменувань (117 кирилицею, 80 латиницею), додатки. Робота ілюстрована 16 рис. та 27 табл.

# Розділ 1

**ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ**

**ІШЕМІЧНОГО ВОГНИЩА ПРИ ІНТРАЦЕРЕБРАЛЬНІЙ ГЕМОРАГІЇ. НАПРЯМКИ, МОЖЛИВОСТІ ТА ЗАСАДИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЇ ТЕРАПІЇ ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ (огляд літератури)**

## Особливості формування провідних ланок патобіохімічного каскаду в нейронах при інтракраніальному крововиливі поліетіологічної природи (субарахноїдальний та внутрішньочерепний крововилив, черепно-мозкова травма)

Порівняльний аналіз літературних даних, щодо особливостей анатомо-морфологічної будови головного мозку вказує на той факт, що він містить, як нейрональні, так і судинні елементи. Тому є всі підстави останній віднести до основних органів-мішеней, що асоційовані із патологією серцево-судинної та центральної нервової системи (ЦНС), у першу чергу, мова йде про артеріальну гіпертензію, особливо поєднану із цукровим діабетом (ЦД) та патологією судин (наявні внутрішньомозкові та екстрацеребральні аневризми) [2, 17–19].

Зважаючи на це, патобіохімічний каскад при геморагічному ураженні мозку, аутентичний тим змінам, які мають місце в нейронах мозку при інших типах інсульту, транзиторних атаках, або реперфузії (ІР) інфаркт-залежної судини [20–23]. Разом із тим, у молекулярних змінах в нейронах при контузії мозку за черепно-мозкової травми (ЧМТ), інсульті, або ж транзиторних ішемічних атаках існують певні відмінності, які обумовлені додатковими чинниками, що призводять до вторинної альтерації клітин. Слід відмітити, що кора головного мозку має високу чутливість до впливу пошкоджуючих факторів, оскільки до її складу входить декілька шарів диференційованих високоспеціалізованих клітин (нейронів), ансамбль яких забезпечує реалізацію вищих нервових функцій [24–32].

Початок патогенетичного каскаду в нейронах при ІР мозку внаслідок інтракраніальноїгеморагії, як і при ІІ на тлі тромбозу, тривалого вазоспазму, або компресії судин ззовні при лікворогіпертензії (підвищений ВЧТ), на тканинному рівні починається із порушень трофіки та мікроциркуляції. Це є підґрунтям до виникнення енергодефіциту за рахунок дискоординації в циклі Кребса і відсутності супряження окисного фосфорилювання із тканинним диханням [19, 33, 34].

В умовах гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) за геморагічним типом на перший план виступає первинна альтерація масиву клітин внаслідок крововиливу, який не пов’язаний із формуванням енергетичної недостатності. Однак, в подальшому, за рахунок рефлекторного церебровазоспазму, мікроциркляторні зміни мають місце, і більш того, виходять на передній план.

Провідні гемодинамічні порушення кровоплину на капілярному рівні при геморагічному типі (ГПМК) пов’язані із різними причинами. По-перше, як ускладнення гіпертензивного кризу відбувається розрив аневризми, або ж капіляру, що є тригерним фактором до активації судинної ланки гемостазу, і реалізується через спазм. Причому, такий спазм охоплює не тільки інфаркт-залежну судину, а й загалом всю судинну сітку, що призводить до трансформації реґіонарної субтотальної ішемії в тотальну. По-друге, черепна коробка являє собою замкнений простір і збільшення параметрів об’єму мозку, у випадку внутрішньомозкового крововиливу (ВМК), або ж при потраплянні крові у САП при однойменному крововиливі призводить до підвищення внутрішньочерепного тиску (ВЧТ). По-третє, в цих умовах за рахунок дисбалансу між утворенням спинномозкової рідини судинними сплетеннями м’якої мозкової оболонки та зворотної реабсорбції, відбувається порушення ліквородинаміки, що ускладнюється у підгострому періоді внаслідок утворення кров’яних згортків та септ. Отже, при ГІ наростаюча черепна гіпертензія призводить до набряку-набухання нейронів, перетискання ззовні судин, яке, власно супроводжується редукцією кровоплину[35]. При всіх варіантах свого розвитку, тензійні порушення призводять до пригнічення кровопостачання, а це у свою чергу супроводжується енергодефіцитом[34, 36,37]. В умовах САК за рахунок об’єму крові, який потрапив у САП та зменшенням сталого об’єму черепної коробки за рахунок наявності гематом, зростають абсолютні значення ВЧТ, що супроводжується дестабілізацією у системі ауторегуляції кровообігу і призводить до погіршення кровобігу в інтрацеребральних судинах, які забезпечують трофіку мозку. Окрім цього, порушується аксональний транспорт внаслідок зовнішнього механічного тиску на кору мозку, з наступним її здавленням. Все це призводить до надмірної активації NMDA-рецепторів та запуску глутамат-кальцієвого патобіохімічного каскаду – основних механізмів апоптотичної та некробіотичної смерті нейронів. Як наслідок, формується деструктивно-дегенеративне вогнище, що спричиняє розвиток патологічно зміненого неврологічного статусу хворих.

Отже,глутаматнаексайтотоксичність та внутрішньочерпна гіпертензія, являють собою потенційнімішені щодо розробок патогенетичної терапії ішемічних уражень мозку, зокрема тих, що асоційовані із високими значеннями ВЧТ. Інтракраніальнагеморагія внаслідок редукції кровобігу по мозковим судинам, є причиною гемодинамічних зрушень, що опосередковано через лікворогіпертензію призводить до енергодефіциту і зменшення пулу макроергів. Отже, енергетичний дефіцит та субстратний голод, який виникає при обмеженні транспорту глюкози – ключовий чинник, що сприяє надмірному накопиченню основного нейротрансмітера нейронів: глутамату (глутаматнаексайтотоксичність), що супроводжується надпороговим збудженням активності NMDA-рецепторів [5, 38–41].

Глуматнаексайтотоксичність деблокує магнієвий «корок», наслідком чого стає лавиноподібне масивне потрапляння іонів кальцію через однойменні канали в цитоплазму нейронів. Надмірне накопичення іонів кальцію є фактором, котрий ініціює принаймні три патогенетичні ланки ішемічного каскаду, що безпосередньо можуть фінішувати загибель нейронів або апоптотичним шляхом, або внаслідок онкозу[42–45]. По-перше, іони кальцію індукують надмірну, лавиноподібну генерацію вільних радикалів, особливо у мітохондріях, що сприяє формуванню мітохондріальної пори; отож даний процес – один із наріжних каменів при розладах енергетичного балансу. По-друге, від наявного пулу іонізованого кальцію залежить експресія активності кальцій-залежної NO-синтази, патологічно змінена активність якої сприяє формуванню нітрозативного стресу, дисбалансу в обміні монооксиду азоту та синтезі ендотелій – релаксуючого фактору, а значить відбувається порушення церебральної мікроциркуляції, що супроводжується енергодефіцитом. По-третє, кальцій відіграє провідну роль у реалізації апоптотичних та некротичних програм, тобто, у підсумку призводить до мембранодеструкції.

Отже, глутаматнаексайтотоксичність, через месенджерні агенти індукує одразу декілька різнонаправлених векторів патобіохімічного каскаду, які, однак, між собою мають тісний взаємозвꞌязок, і фармакологічно, діючи на первинну ланку (глутамат), можна отримати віддалений метаболітотропний ефект [38, 46, 47]. Енергетичний голод, оксидативний та нітрозативний стрес, відіграють провідну роль в апоптозі нейронів при ГІ, а енергія акумульована у макроергічнихзвяꞌзках – лімітуючий фактор напрямку, за яким буде відбуватись елімінація необоротно ушкоджених клітин: апоптозу або онкозу (некрозу). В метаболічному сенсі, принципова різниця між цими двома видами клітинної загибелі полягає у тому, що апоптоз, на відміну від некрозу – це енергоємний процес, оскільки протікання кожної стадії, регулюється великою кількістю біологічно-активних речовин, ферментів, тощо, для функціонування яких необхідна АТФ. З морфологічної точки зору, ці явища різняться за наявним збереженням цілісності мембранної стінки. Так, якщо при апоптозі вона не ушкоджується, то при онкозі – навпаки, наявні чисельні розриви мембран, вихід протеолітичних ферментів та інших цитотоксичних продуктів оксидативного стресу назовні, що знаменується розвитком асептичного запалення у вогнищі геморагії, яке підтримує його експансію [48–52].

Окреслені метаболічні зміни набувають ще більшої тяжкості в умовах гіперглікемії, наприклад при ЦД, особливо першого типу. У першу чергу, це пов’язано з тим, що постійна довготриваюча гіперглікемія чинить нейротоксичну дію не тільки на периферичну ЦНС, а й на клітини мозку [17, 53, 54]. При цьому, не дивлячись на той факт, що в крові концентрація глюкози може перевищувати її фізіологічну норму в рази, у клітини вона, через відсутність інсуліну, потрапити не може, а значить має місце субстратнийенергодефіцит, навіть за нормальних показниках мікроциркуляції та локального кровоплину. Така гіперглікемія, окрім нейротоксичної дії, чинить також і ендотеліотоксичний вплив, що в підсумку погіршує кровопостачання як мозку, так і інших органів мішеней при ЦД [53, 55]. Це пов’язано із тим, що при довготривалій некомпенсованій гіперглікемії, накопичується глікозильований гемоглобін, який через морфо-структурні зміни в ендотелії сприяє діапедезу форменних елементів та імбібіції (просякнення) кров’ю нервової тканини в басейні патологічно зміненої судини. При прогресуванні та відсутності належної компенсації, можливий розрив судини або ж аневризми, з наступною екстравазацією крові в мозок чи САП. Таким чином, ЦД є важким преморбідним фоном, який через порушення всіх видів клітинного метаболізму (в першу чергу, вуглеводного та жирового), значно погіршує перебіг інтракраніального крововиливу різного ґенезу.

## 1.2. Програма цитопротекторної терапії (у тому числі нейропротективної) в Україні та за кордоном: здобутки, недоліки та новітні напрями розвитку

В Україні та на теренах переважної більшості країн пострадянського простору, ще в середині 90-х років почали інтенсивно розвиватись засади та основні напрямки цитопротективноїметаболітотропної терапії захворювань різнонаправленої етіології, патогенез яких пов'язаний із формуванням ішемічно-гіпоксичного каскаду постгеморагічної природи [56–58]. Відповідно до цього, зꞌявилась ціла низка препаратів-органопротекторів, зокрема церебро-(нейро-), кардіо-, офтальмо- гепато- та нефротропної природи. Причому, за багатьма напрямками вони мали спільні покази до застосування, оскільки в абсолютній більшості випадків, механізми їх захисної дії ґрунтуються на антигіпоксичній, антиоксидантній та енергомодулювальній активності, тобто вони спроможні впливати на широкий спектр нозологій ішемічно-гіпоксичної природи, не зважаючи на те, в якій системі органів мав місце процес [59, 60]. Отож не дивно, що препарати цієї спрямованості дуже швидко завоювали фармацевтичний ринок та міцно увійшли до схем лікування як хронічних захворювань, так і ургентних станів.

В деяких країнах, препарати із подібними властивостями входять до обов’язкових при наданні невідкладної патології та включені до відповідних протоколів, рекомен-дацій та настанов. І дійсно, порівнюючи механізм їх цитопротективної спрямованості з патогенезом захворювань ЦНС та серцево-судинної систем (інсульт, інфаркт, ЧМТ), хвороб печінки та нирок (гепатити різної природи, нефрити, печін-кова та ниркова недостатність, тощо) на лице цілковита компліментарність [61]. Крім того, вирішу-валось питання поліпрагмазії, яке завжди присутнє у пацієнтів реаніматологічного профілю, у котрих одночасно має місце одразу декілька синдромокомплексів та ці зміни пов’язані із ІР або гіпоксією вітальних органів і систем. Неврологічна практика не стала винятком. Зважаючи на анатомо-мофологічніособ-ливості ЦНС та той факт, що для широкого кола захворювань (артеріальна гіпертензія, ЦД, травми, тощо), мо-зок та його судини, є первинними мішенями, цілком доречною та спроможною стала екстраполяція механізмів дії цитопротекторів, які вже знайшли своє застосування в неврології [63–66]. Це, здебільшого, робило правомірним застосування неврологами та реаніматологами препаратів із вираженими антигіпоксичними, антиоксидантними та ангіопротективними якостями, прямими показами до застосування яких був інфаркт міокарда та інша гостра судинна патологія.

У цьому розрізі, перед клініцистами стають нагальними два питання. Перше з яких, зважаючи на тривалі традиції практичного застосування органопротекторів, могло бути вирішеним та давно з’ясованим, і криється воно у належній доказовій базі ефективності, тобто мова йде про засади так званої «доказової медицини» та виконання принципів «належної клінічної практики». Згідно визначення терміну «доказова медицина», яке наведено у Фармацевтичній енциклопедії − це застосування у щоденній медичній діяльності (у діагностиці, лікуванні й профілактиці) медичних технологій та лікарських засобів, ефективність яких встановлена у фармакоепідеміологічних дослідженнях із застосуванням математичної імовірності успіху й ризику [67–71]. Основним методом доказової медицини, є рандомізовані контрольовані дослідження, інформація про які міститься у основних базах (12 Центрів доказової медицини, таБаза даних Кокранівського товариства). За інформацією баз формуються Міжнародні рекомендації щодо ведення хворих з тією чи іншою патологією. Прикладом, можуть стати Європейські рекомендації щодо ведення пацієнтів із ГІ або ІІ та транзиторними ішемічними атаками (ЕСО, 2008), де представленні виключно препарати і заходи, ефективність яких доведена. Згідно настанов ЕСО, єдиним препаратом, який ефективно долає вторинний церебровазоспазм при ГІ, є антагоніст Са2+ – німодипін (німотоп).

Зважаючи на це, німодипін можливо розглядати як первинний нейропротектор при САК і ВМК, і це твердження доведено з позиції доказової медицини у цілій низці подвійних сліпих плацебо-контрольованих дослідженнях, якими і обґрунтовують свою думку експерти ЕСО.

Разом із цим, призначення німодипінусупряжено із цілою низкою ускладнень та особливостей, що обмежує повномаштабне використання препарату. На фармацев-тичному ринку України представлено дві форми випуску німодипіну – розчин для ін-фузій та таблетована форма. Проведення інфузії можливе лише у відділеннях реаніма-тологічного профілю, під постійним моніторингом основних вітальних показників (АТ, ЦВД, респіраторна система), і згідно до інструкції виробника, виконується через інфузоматну систему (затемнена) виключно у центральну вену (внутрішня яремна, підключична, стегнова). Даний факт обумовлений тим, що, незважаючи на переважну тропність до Са-каналів церебральних судин, прискорена або неправильно проведена інфузія призводить до блискавичної важкокерованої артеріальної гіпотензії (судинний колапс). Таке ускладнення супроводжується вторинною церебральною гіпоксією, що може бути фатальним.

Альтернативою до внутрішньовенного (в/в) введення, може стати пероральний прийом препарату, оскільки фармакокінетичні та фармакодинамічні параметри стартової в/в дози, яка становить 30 мкг/кг/хв, а таблетованої у 60 мг/4 рази/добу, є еквівалентними, а ризик розвитку гострої судинної недостатності при цьому зводиться до мінімуму. Слід зауважити, що переважна більшість пацієнтів у найгостріший період ГІ (ВМК, і, ще більшою мірою при САК) перебувають у комі, потребують штучної вентиляції легень, тому пероральний прийом можливий лише через оро- (назо-)гастральний зонд після інтубації трахеї, трахеотомії, конікотомії або встановлення ларенготрахеальної маски. Лише у поодиноких випадках наявного самостійного ковтального рефлексу можливий пероральний прийом німодипіну без протекції дихальних шляхів. Інше серйозне ускладнення ГІ, яке є відносним протипоказом для початку терапії німодипіном – це підвищений ВЧТ, хоча сам препарат не призводить до гіперпродукції ліквору. Оскільки високий показник ВЧТ є одним із провідних патогномонічних синдромів при САК, необхідно знизити його цифри, що потребує часу і відстрочує початок терапії. Коротко резюмуючи дані доказової медицини, обрання німодипіну в якості рефренсного препарату при доклінічній оцінці ефективності нових підходів до терапії ГІ є доцільним і обґрунтованим про що більш детально буде описано нижче (див. Розділ 2).

Традиційно існує ряд медикаментозних засобів, які можуть зменшити гіпер-продукцію ліквору судинами IV шлуночка. Їх всі можна віднести до вторинних нейропротекторів. Перш за все – це діуретики (фуросемід, манітол, діакарб). Однак, перераховані препарати призводять до внутрішньонейрональної дегідратації, тією чи іншою мірою зменшують показники системної (АТ та ЦВД), периферичної та внут-рішньомозкової (ступень насичення крові киснем (SaO2); об'ємна швидкість моз-кового кровотоку (ОШМК)) гемодинаміки, вихідні рівні яких можуть бути зни-женими в залежності від важкості інсульту. Отже призначення і ефективність діуре-тиків, незважаючи на їх прямий патогенетичний вплив на ВЧТ, є дискутабельним і потребує ретельного моніторингу та індивідуального підходу до вибору оптимального препарату та його дозового режиму. Саме таких висновків дістали експерти з ESС 2008, грунтуючись на даних системного аналізу подібних призначень.

Позитивним чином на мозковий кровоплин діють розчин магнію сульфату, гангліоблокатори (пентамін, бензогексоній), нейролептики, та препарати для наркозу у випадку необхідності створення медикаментозного сну (адаптація до апаратного дихання) та керованої гіпотензії.

У ряді випадків при нестабільній гемодинаміці, в якості засобу, що певним чином, може зменшити гіперпродукцію ліквору, є представник глюкокортикоїдівдексаметазон. Його дія на ВЧТ супряжена зі стабілізацією АТ та зменшенням проникності судинної стінки. Дієвість, доцільність та необхідність використання всіх вище перерахованих засобів як нейропротекторів, подібна до заключень експертів EСО стосовно діуретиків, і грунтується виключно на засадах доказової медицини.

На основі Міжнародних та Європейських протоколів, створюються і вітчизняні [72,73]. Всебічний неупереджений огляд літературних джерел показав відсутність належної Міжнародної доказової бази, що ґрунтується на результатах контрольованих досліджень для органопротекторівметаболітотропної спрямованості [74,75]. З іншого боку, ефективність препаратів цієї категорії висвітлена у багатьох вітчизняних публікаціях та статтях країн пострадянського простору, на теренах яких, власне, вони і найбільше використовуються. Численні спроби довести ефективність деяких із них за канонами доказової медицини потерпіли фіаско [50, 76, 77]. Так, свого часу клініцисти покладали надії на нейропротективні ефекти найбільш відомих із них: цитиколіну та церебролізину. Однак, сподівання виявились марними і за результатами останніх Міжнародних рандомізованих клінічних випробовувань дієвості при гострій церебральній ІР була доведена їх неспроможність, хоча результати багатьох досліджень на малих нерандомізованих вибірках показали їх високу ефективність [78–80]. Аналогічним чином склалась ситуація із антигіпоксантами та метаболокоректорами (корвітин, мілдронат, мексидол, тощо). У країнах Європейського союзу, США дуже суворі критерії відбору претендентів до включення їх у національні рекомендації, тому органопротектори до подібних настанов не входять, хоча і не відкидається перспективність розробок препаратів із такими властивостями[81–83]. На думку фармакологів, найбільш короткий та цілеспрямований шлях розробки нейропротекторних препаратів може стати їх впровадження через неврологічну практику. Тобто, церебропротектори– це ідеальні претенденти на роль препаратів із захисною дією на мозок, проте, жоден із них не пройшов випробовування через багатоцентровірандомізовані клінічні дослідження. Антигіпоксанти, теж є претендентами за спільністю патогенезу ураження мішеней судинної патології, а ситуація з ними аналогічна, описаній вище. Нещодавно, одним із таких претендентів, на короткий час став мілдронат – метаболокоректор із антигіпоксичними якостями, який вже декілька десятиліть використовується в неврології, кардіології та реаніматології. Міжнародний олімпійський комітет на останніх зимових іграх увів мілдронат до розряду допінгових, що стало ледве не стало маркером його ефективності як лікарського препарату, який покращує метаболізм [84]. Зважаючи на це, Президент комітету був вимушений виголосити заяву, що їх рішення не замінює принципи доказової медицини, до клінічної практики не відноситься, і регулює лише використання препарату у професійному спорті [85].

Інша причина, яка стає на заваді розробки та широкого офіційного впровадження нейропротекторів при ГІ, криється у відсутності єдиних уніфікованих національних протоколів та настанов по наданню невідкладної допомоги хворим із ГПМК, травмою, аневризмою, тощо. Саме тому, у кожному відділенні існують свої «традиції» щодо ведення таких пацієнтів, а коло препаратів котрі використовуються у якості протекторів, є дуже широким. Нажаль, для більшості із них, в інструкції відсутні покази до застосування у галузі неврології, і використовуються лікарями вони емпірично, ґрунтуючись на подібності патогенезу уражень нейронів мозку, а також тотожності будови судин мікроциркулятрного русла [86]. Можливість розширення інструкції органопротекторів для їх офіційного застосування за новим призначенням в якості церебропротекторів лімітоване проведенням спочатку відповідних доклінічних, а згодом і клінічних випробовувань.

Проблему впровадження у практичну неврологію та реаніматологію нейропро-текторних засобів, можна умовно поділити на два принципово різні підходи. Перший, полягає у виявленні нової біологічноактивної речовини із цитопро-текторною активністю в умовах модельної мозкової ІР різного ґенезу (у т.ч. гемо-рагічного), доклінічне вивчення її механізмів захисної дії та встановлення безпечності.

Отримані дані можуть стати підґрунтям для створення на її основі промислового зразка фармацевтичної композиції для більш поглибленої доклінічної оцінки. Пізніше може йти мова про планування клінічних випробовувань ефективності цього оригінального лікарського засобу [60,87]. Подібне впровадження потребує значного фінансування та десятки років праці спеціалістів різних галузей. Другий підхід, полягає у виявленні у вже відомих препаратів, які застосовуються в клінічній практиці, нових видів фармакологічної активності (у даному випадку нейропротекторної), що дозволить використовувати цей лікарський засіб за новим призначенням. В цих умовах після проведення відповідних експериментальних досліджень, клінічна оцінка розпочинається одразу з другої фази. Це вигідно з економічної точки зору, особливо для препаратів вітчизняного виробництва.

## 1.3.Проблеми адекватності моделей церебральної гострої ішемії по типу внутрішньочерепного крововиливу (ВЧК) аналогічній клінічній патології у людини

З-поміж сотень протестованих біологічно-активних сполук, що були цілеспрямовано створені хіміками-синтетиками, які розробляли в якості майбутніх перспективних нейропротекторів, попри всі зусилля фармакологів та неврологів, жодна не стала фундаментом для нового лікарського засобу із цими якостями, який би в подальшому пройшов відповідність згідно засадам доказової медицини [88]. Цілком оптимістичні результати доклінічних досліджень, які присвячені вивченню специфічної активності (в даному випадку, мова йде про церебропроктивну) у нових препаратів, на клінічному етапі при проведенні багатоцентровихрандомізованихвипробовувань не знаходять свого підтвердження [50, 74, 89, 90].

Серед багатьох причин незадовільних результатів упровадження в практичну медицину нових препаратів, слід відмітити відсутність автентичності та репрезентативності моделей ішемічно-гіпоксичного ураження мозку геморагічного ґенезу у тварин, відповідній патології у людини. Крім того, необхідно підібрати оптимальний видовий склад дослідних тварин, оскільки навіть серед гризунів є види у котрих сильно різниться система кровопостачання голови (мозку). Даний факт унеможливлює уніфікований підхід для доклінічного скринінгу нейропротекторної активності серед препаратів даного спектру фармакологічної дії. Саме пошук або розробки оптимальної моделі, яка б задовольняла цим цілям, розпочинається створення дизайну будь-яких доклінічних досліджень [91, 92].

Для скринінгової оцінки, в якості тварин можна використати всі типові лабораторні тварини: кролів, щурів та, за наявності, монгольських піщанок (гербел) [27, 93–95]. Для вирішення таких задач у ВНМУ імені М. І. Пирогова було створено окремий структурний підрозділ, науково-педагогічної спрямованості Навчально-науково-дослідну лабораторію «Фармадар» (ННДЛ «Фармадар»). За весь період свого існу-вання (січень 2016 – червень 2019) аспіранти та докторанти, які проходили стажуван-ня на базі ННДЛ «Фармадар» за циклом по вибору «Доклінічні експериментальні дослідження» розробили ряд методик по доклінічній оцінці ефективності нових лікарських засобів та біологічно-активних речовин, на які у подальшому було отримано свідоцтва та патенти України на корисну модель [96]. Переважна їх більшість торкалась можливості моделювання різних патологічних станів. Також розроблено методики реєстрації параметрів основних вітальних функцій (гемодинамічні та респіраторні показники), котрі можливо виміряти за допомогою відповідних датчиків до модулів елекро-фізіологічного обладнання Transonik S100.

Такі методики включені у Галузь технічної компетентності лабораторії. Так, наприлад, було апробовано та відпрацьовано модель ГІ по типу субарахноїдального крововиливу (САК), задачею якої стало забезпечення стандартизованих умов відтворення геморагічного та травматичного ураження головного мозку, шляхом введення фіксованого об’єму аутокрові у САП. Запропонована модель САК у щурів, яка диференціюється по важкості на три ступеня в залежності від об’єму крові введеній у підпавутинний простір головного мозку, являє собою раціональну, валідизовану систему для первинного скринінгу перспективних нейропротекторів, що за сукупністю критеріїв (летальність (виживаність), неврологічний дефіцит, нейромаркерна активність), дає змогу всебічно та ґрунтовно оцінити їх доклінічну ефективність та, в подальшому, екстраполювати отримані дані на клінічні умови.

Поряд із моделями, другим, не менш важливим при доклінічній оцінці ефективності перспективного нейропротектора, є маркерні величини обꞌєктивної оцінки його ефективності. Необхідні чіткі критерії, які спроможні віддзеркалити та ідентифікувати морфо-функціональний стан доцільно було виявити можливості імуноферментного визначення у сироватці крові активності нейронспецифічноїенолази (NSE) та змін титрів S100, які широко використовують у неврології при оцінці ступеню та глибини нейродеструкції при ішемічному ураженні мозку. До переваг цих маркерів можна віднести їх високу чутливість. Апробацію ефективності маркерів вирішили провести при виконанні моделі САК, оскільки за цих умов в залежності від кількості крові, ступінь пошкодження мозку різнився, і при дієвості маркерних величин, це знайшло своє закономірне віддзеркалення у міжгрупових відмінностях. До функціональних критеріїв, що безпосередньо впливають на патогенез ішемічного каскаду, є внутрішньочерепний тиск (ВЧТ), визначення якого доцільно проводити в динаміці терапії.

## 1.4. Доцільність доклінічної оцінки блокаторів різних сайтів NMDA-рецепторів, як перспективних нейропротекторів при деструктивних захворюваннях мозку ішемічної та геморагічної природи

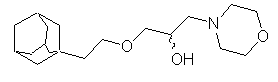
Враховуючи наведені дані стосовно провідної ролі глутаматноїексайтотоксичності у розвитку деструктивно-дегенеративних змін в мозку при його ішемічно-геморагіч-ному ураженні, в якості перспективних нейропротекторів увагу привернули саме блокатори NMDA-рецепторів – похідні адамантану (адемол, мемантин і амантади-ну сульфату). Покази до їх призначення не розглядаються в площині органопротекції з прикладною точкою та можливістю застосування в невідкладній невро-логії при САК, що потребує ґрунтовної доклінічної оцінки у цьому напрямку [8, 45, 74].

Вперше, амантадин було запропоновано у ролі антивірусного препарату. У подальшому встановлено, що даний лікарський засіб лібералізує вивільнення дофаміну з внутрішньонейронального пулу, підвищуючи рецепторну чутливість до нього, і навіть в умовах недостатності останнього у базальних гангліях, нормалізує перебіг нейрофізіологічних процесів. Завдяки модулювальному впливу амантадину на активність NMDA-рецептори, цей препарат знайшов своє застосування при лікуванні екстрапірамідних порушень при хворобі Паркінсона, дискінезій різного ґенезу (викликаних прийомом леводопи, нейролептиків тощо). Фармацевтична промисловість випускає два хімічні підрозділи солей похідних амантадину: сульфатну та гідрохлоридну солі. Серед гідрохлоридів амантадину відомі такі препарати як мідантан, неомідантан, амантадин; сульфатів – ПК-Мерц. Амантадину сульфат та гідрохлорид майже не різняться за своїми фармакодинамічними активами, однак мають відмінності за фармакокінетичними параметрами. Амантадину сульфат забезпечує більш стабільну концентрацію препарату в структурах мозку, ліпше переноситься хворими і йому притаманні порівняно менші побічні явища. Лікарські засоби на основі амантадину гідрохлориду (наприклад, мемантин) широко застосовуються при терапії судинної деменції, хвороби Альцгеймера і розсіяного склерозу. Винайдено водорозчинну форму амантадину сульфату ПК-Мерц – препарат для довенного застосування. На сьогодні тривають клінічні дослідження стосовно ефективності цього розчину при ЧМТ та судинних захворювань ЦНС [7, 97–100].

З-поміж неповних блокаторів NMDA-рецепторів, своєю безпечністю та довготривалою історією клінічного застосування виділяється сульфат магнію [101]. Встановлено, що іони магнію потенціал-залежно блокують NMDA-асоційовані канали. На моделях експериментальної церебральної ІР доведено, що на тлі застосування магнію сульфату відбувається суттєва, достовірна редукція ділянки ІР, а у пацієнтів із гострою церебральною ІР, інфузія цього препарату зменшує летальність та сприяє редукції неврологічного дефіциту поряд із поліпшенням неврологічного статусу [101, 102]. Однак, останній час все більше клініцистів схиляються до висновку, отриманого в результаті численних мета-аналізів, згідно яких в/в введення MgSO4 було ефективним в ранні терміни ішемічного ураження головного мозку, але не покращує функціональний результат та сметрність через 90 днів після інсульту [102, 103]. Вважають, що його використання повинно бути обережним і вибірковим, наприклад, у хворих із високим АТ.

Таким чином, є вагоме підґрунтя для доклінічної оцінки ефективності зазначених блокаторів NMDA-рецепторів за новим призначенням в якості нейропротекторів при ішемічному та геморагічному ураженні мозку. В цьому аспекті, нашу увагу привернуло одне із похідних адамантану, а саме 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлорид – Адемол, виробництва ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»» (Київ, Україна) (рис. 1.1).

Молекула 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду структурно подібна до амантадину та кардіонеселективного β-адреноблокатора пропранололу



•НСl

Рис. 1.1. Просторовий хімічний скелет адемолу (1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду)

Наявністьофтальмо-, ретино-, нейро-, кардіо-,термо-актопротекторної, антигіпоксичної, протиішемічної, анксіолітичної, ноотропної, аналгетичної та адаптогенної дії, а також притаманні йому антихолінестеразні, гангліо- та β-адреноблокувальні ефекти [6, 11, 12, 14, 105, 107–118], дають підстави сподіватись на можливе виявлення у адемолу захисної дії на мозок і в умовах ГІ.

Підґрунтям для поглибленого дослідження церебропротекторних властивостей промислового зразка 1,0 % розчину адемолу («Дарниця», Україна), стали результати, отримані д.мед.н., проф. Ходаківський О. А. на базі кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова та ННДЛ «Фармадар» у доклінічних дослідженнях, які були присвячені оцінці його захисних властивостей на головний мозок при модельному ІІ, ретинальній ІР, або гострій офтальмогіпертензії, і опубліковані в монографії [16].

Так, іnvivo та invitro завдяки використанню уніфікованого методу у доклінічних дослідах, на різних моделях ІІ, або при експериментальному ураженні сітківки з’ясовано різноманітний спектр захисної дії розчину адемолу, який реалізувався на різних рівнях (від молекулярно-морфоструктурних змін в нейронах до формування неврологічного статусу та реалізації зорової функції). Доведено, що нейропротекторна активність адемолу на тільки зіставляється, а й подекуди достеменно переважає дієвість таких референтів, як амантадину і магнію сульфату, цитиколін, пірацетам, мексидол,актовегін, тіотриазолін, абокорвітин. На користь подібного твердження вказує його здатність умовно-ефективною терапевтичною дозою 2 мг/кг внутрішньоочеревинно (в/о) зменшувати летальність, відстрочувати загибель тварин, зменшувати патологічну неврологічну симпоматику та покращувати морфо-функціональну цілісність кори мозку і сітківки [110–116, 120]. У цих умовах, єдиний механізм протекторної дії адемолу пов'язано з модулювальним впливом на активність NMDA-рецепторів, стимуляцією кровопостачання головного мозку та ока, усуненням в нейронах кори, гіпокампу і сітківки енергодефіциту, метаболічного ацидозу, оксидантного пошкодження, модулювальною дією на баланс монооксиду азоту, збереженням цитоархітектоніки обох органів, у тому числі за рахунок редукції апоптотичних і некробіотичних програм [110, 111, 120].

Результати досліджень останніх років довели, що первинною та ведучою ланкою, існування котрої сприяє ініціації вищевказаного комплексу нейроцитопротекторних механізмів адемолу, є його здатність, як модулятора поліаміновигосайтуNMDA-рецепторів перешкоджати формуванню глутаматноїексайтотоксичності без розвитку типових побічних ефектів, що притаманні повним блокаторам N-метил-D-аспартатного сайту [11, 116–120].

При оцінці фармакологічних характеристик аспартат-активованих струмів на ізольованих гіпокампальних нейронах гіпокампу новонароджених білих щурів лінії Вістар WAG\GS з’ясовано, що досліджуване похідне адамантанувиступає якантагоніст/агоністполіаміновогосайтуNMDA-рецепторів [11, 120]. За рахунок цього він перешкоджає формуванню деструктивно-дегенеративних змін, безпосередньо патофізіологічно асоційованих глутаматноюексайтотоксичністю. Біологічно-активні речовини із подібним механізмом дії маютьнейротрофічну та нейрореставраційну складову та здатніпідвищуватиекспресіюбілківпам'ятіCREB. Варто відмітити, що препарати із зазначеною дією наполіаміновийсайтNMDA-рецепторів не призводять до появинебажаних побічних ефектів з боку ЦНС, які притаманні повним блокаторам фенциклідиновогосайту і проявляються у виглядікогнітивно-мнестичнихрозладів.

Однією із рецепторних відмінностей адемолу від інших похідних адамантану, є його антагонізм до β-адренорецепторів, який проявляється за рахунок хімічної подібності амінного фрагменту до пропранололу і забезпечує кардіопротекторну активність при модельному інфаркті міокарда, гострій адреналіновій кардіоміопатії та супроводжується утеротонічним ефектом [119]. Встановлено, що завдяки неселек-тивній блокаді β-адренорецепторів у венулах твердої мозкової оболонки (синуси мозку) мальпігієвих судинах та капілярах судинних сплетень ока, адемол знижує під-вищеннийвнутрішньочний тиск та ВЧТ при вищевказаних моделях ІР мозку та зоро-вого аналізатора [120]. При ГІ це потребує додаткового з’ясування та обґрунтування.

Аналізуючи викладені факти, можна припустити, що адемол як і його структурні аналоги із класу адамантанів та адреноблокаторів, може володіти доброю ліпофільною активністю, що призведе до його вільного проникнення через гематоенцефалічний бар’єр (ГЕБ), що як і у випадку теоретичного опису можливих механізмів у зниженні ВЧТ потребує доказу.

Недостатньо висвітленими є питання впливу адемолу на формування стероїдної нейротоксичності, яка приходить на зміну глутаматноїексайтотоксичності. Її розвиток пов'язаний із надмірним впливом на пірамідні нейрони кори головного мозку та СА1гіпокампальні зони підвищених титрів стресороформуючого гормону кортизолу. Співробітниками кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова оцінили наявні стреспротекторні властивості адемолу (актопротекторна та адаптогенна дія), що дає змогу сподіватись на наявність у нього і антинейростероїдної дії в умовах САК.

**Висновок до розділу 1**

Незадовільні результати лікування уражень мозку, як наслідок ішемічно-гіпоксичного процесу при ГІ, поєднуються із високим відсотком смертності та інвалідизації хворих, що, здебільшого, можна асоціювати та пояснити відсутністю уніфікованих протоколів надання невідкладної та кваліфікованої медичної допомоги із залученням церебропротекторів із доведеною згідно засад доказової медицини ефективністю, що і обґрунтовує медично-соціальну значущість розробки та упровадження препаратів цього класу. Глутаматнаексайтотоксичність, яка опосередкована надмірним перезбудженням NMDA-рецепторів, дефіцит внутрішньо-нейронального енергозабезпечення, зміни оксидантно-антиоксидантного балансу, регуляції кислотно-лужної рівноваги, обміну оксиду азоту – все це являє собою перспективний шлях, за яким варто здійснити фармакологічну розробку первинної цереброротекторної програми, зокрема і за рахунок розширення показань до застосування вже відомих та зареєстрованих у Державному фармакологічному центрі лікарських засобів із NMDA-модулювальною дією за новим призначенням. Таким лікарським препаратом, зважаючи на дані, що отримано співробітниками ВНМУ ім. М.І Пирогова на моделях патологічних станів, відмінних від ГІ, однак які мають подібні не патогномонічні до крововиливу в мозок синдромокомплеси, може стати таке похідне адамантану, як 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлорид – адемол, який виробляється із готової хімічної сировини "inbulk" на базі виробни-чихпотужностей ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»» (м. Київ, Україна).

В наведеній оглядовій частині рукопису представлено та проаналізовано особливості патобіохічного каскаду в нейронах (глутаматна і стероїдна токсичність, енергодефіцит, оксидативний та нітрозативний стрес, апоптоз, нейронекроз) при ГІ та труднощі при розробці і впровадженню нових нейропротекторів. Теоретично зорієнтовано та намічено можливий напрямок фармакологічного пошуку перспективного протектора, яким може бути адемол. Заплановано оцінити та з’ясувати нові можливі види активності при даному патологічному стані шляхом вивчення особливостей фармакодинамічних аспектів в умовах модельного інтракраніального крововиливу, після розробки адаптованої та валідизованої моделі ГІ. З метою вивчення можливих механізмів протекторної дії адемолу в цих умовах, доцільно дослідити вплив препарату на інтенсивність нейродеструктивних змін, енергозабезпечення, процеси ПОЛ та окисної модифікації білків, реалізацію феномену нейроапоптозу, глутаматної і стероїдної ексайтотоксичності.

**Розділ 2**

**МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

## 2.1. Опис дослідних тварин та умови їх утримання

Експерименти виконано на 1144 білих нелінійних статево зрілих щурах-самцях, віком 2,5–3 міс із середньою масою тіла не менше 160 г (160–180 г).

Під час роботи з лабораторними тваринами дотримані методичні рекомендації «Державного фармакологічного центру МОЗ України» [121] та ін. нормативних документів з доклінічного вивчення потенційних лікарських засобів [122, 123], вимоги біоетики згідно до “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, затверджених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986), директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 “Про захист тварин від жорстокого поводження” [124–126]. Дотримання етичних норм засвідчено комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова (протокол №3 від 25.05.2020).

Лабораторні тварини знаходились у віварії ВНМУ ім. М.І. Пирогова на стандартизованому нутрітивному балансі із довільним забезпеченням кип'яченою охолодженою водою у скляних поїлках та харчами за температури навколишнього середовища 21–25оС, відносній вологості повітря 54–59 % та циклічній зміні штучного освітлення щопівдоби. Головна складова раціону тварин складалась із стандартизованої збалансованої суміші зернових (пшениця, овес, кукурудза, ячмінь), білого пшеничного хліба, коренеплодів (буряк, морква), білокачанної капусти, молока, трави (конюшина), повнораціонного гранульованого комбікорму.

Вибірка та рандомізація і розподіл щурів по дослідним групам відбувалась за методом мінімізації відхилень по масі тіла натще. Розподіл тварин на серії дослідів відповідно до мети та завдань дослідження наведений в табл. 2.1 та 2.2.

До експерименту обирались лише тварини у задовільному соматичному стані, які мали гарні екстер’єрні властивості (маркер здорового стану).

Таблиця 2.1

Рандомізація щурів по дослідним групам

при субарахноїдальному крововиливі

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| №№  серії | Вектор експериментального напрямку | | Сумарна кількість щурів | |
| **Модель субарахноїдального крововиливу у щурів** | | | | |
| 1 | Апробація та відпрацювання моделі субарахноїдального крововиливу у щурів із паралельною оцінкою ступеня його важкості в залежності від об’єму крові введеній у підпавутинний простір за критеріями: | показника летальності | 28 | 112 |
| неврологічним дефіцитом | 28 |
| нейромаркерної активності | 28 |
| внутрішньочерепного тиску | 28 |
| 2 | Оцінка нейропротекторної активності адемолу, німодипіну, амантадину та магнію сульфату за: | динамікою летальності щурів із модельним субарахноїдальним крововиливом | 120 | 162 |
| неврологічний дефіцит | 42 |
| 3 | Оцінка функціональних параметрів: | мозковий кровоплин (об’ємно) | 21 | 63 |
| мікроциркуляція в корі мозку |
| артеріальний тиск |
| центральний венозний тиск |
| насичення крові киснем |
| внутрішньочерепний тиск | 42 |
| 4 | Верифікація нейромаркерів | активність енолази | 42 | 42 |
| 5 | Дослідження метаболічних процесів у головному мозку за умов внутрішньочерепного крововиливу на тлі фармакотерапії адемолом | Енергетичний та вуглеводний баланс,оксидативний та нітрозативний стрес, обмін монооксиду азоту в мозку | 90 | |
| **Всього щурів** | | | **379** | |

Таблиця 2.2

Рандомізація щурів по дослідним групам

при внутрішньомозковому крововиливі

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вектор експериментального напрямку | | | Сумарна кількість щурів | | |
| **Модель внутрішньомозкового крововиливу у щурів** | | | | | |
| Оцінка нейропротекторної активності адемолу, німодипіну, амантадину та магнію сульфату: | за динамікою летальності щурів із модельним внутрішньо мозковим крововиливом | 236 | | | 416 |
| за динамікою неврологічного дефіциту | 90 | | |
| нанавчання та пам'ять щурів ізвнутрішньомозковим крововиливом | 90 | | |
| Оцінка функціональних параметрів | мозковий кровоплин (об’ємно) | 21 | | | |
| мікроциркуляція в корі мозку |
| артеріальний тиск |
| центральний венозний тиск |
| насичення крові киснем |
| Верифікація нейромаркерів | рівні енолази | 42 | | 132 | |
| вміст білку S100 | 90 | |
| Протоково-цитометричний аналіз | фрагментація ДНК (апоптоз) | 32 | | 64 | |
| фаза S (гліальна проліферація) | 32 | |
| ВЧТ Глутаматна та стероїдна нейротоксичність | рівень кортизолу | 42 | | | |
| **Всього щурів** | | **765** | | | |

Період профілактичного карантину та акліматизації щурів напередодні формування груп становив 14 діб, при умові щоденного поголівного огляду дипломованим ветеринаром та зоотехніком.

Всі травматичні маніпуляції зі щурами по моделюванню патологічного стану виконували в асептичних, однакових для всіх груп в умовах при анестезіологічному забезпеченні пропофолом (дипріваном) («FreseniusKabi», Австрія), дозою 60 мг/кг в/о, або в/в, з розрахунку 10 мг/мл, у раннішній період (з 8-ої до 13-ої год).

## 2.2. Відтворення моделей інтракраніальноїгеморагії: відтворення субарахноїдального та внутрішньомозкового крововиливу. Методологія оцінки виживаності тварин, неврологічного статусу, мнемотропної активності та показників вітальних функціональних параметрів

Порівняльну оцінку впливу промислового зразка 1,0 % розчину адемолу та референс-препаратів на виживаність, неврологічний статус, мнемотропну активність, функціональні показники мікроциркуляції, церебральної та центральної гемодинаміки, коливання ВЧТ, біохімічні та морфоцитометричні зміни, проводили в умовах експериментального ГІ: ВМК та САК.

ВМК середнього ступеня тяжкості моделювали за шляхом введення у внутрішню капсулу головного мозку (стереотаксичні координати проекції: Н=7,0 мм, L=3,0 мм, А=1,5 мм від брегми) аутокрові (20 мкл/100 г) [128].

Модель САК відтворювали ін'єкцією через катетер у САП (трепанаційний отвір локалізувався у місці аналогічному до попередньої моделі ВМК) гепаринізованоїаутокрові (0,1 мл/кг) [127–129]. Обидві моделі віддзеркалюють клінічну картину ГІ, і є адекватними для доклінічного вивчення потенційних нейропротекторних речовин [128-130]. На перших етапах, при первинній оцінці нейропротекторної активності адемолупоріняно із референсами, особливо на етапі скринінгу ефективність оцінювали за виживаністю тварин (показник летальності у %).

Неврологічний статус (дефіцит) у щурів із ГІ верифікували за шкалою stroke-index C.P. McGraw [95], що є аналогом клінічної шкали ком Глазго, де оцінку проводять у балах.

Навчальну спроможність тварин з ГПМК виявляли за допомогою тесту умовної реакції пасивного уникання (УРПУ) [131].

Функціональні гемодинамічні показники вимірювали за допомогою електрофізіологічного обладнання Biopaс (США) (рис. 2.1–2.3).

Параметри церебрального кровоплину: показник обємної швидкості мозкового кровотоку (ОШМК) в мл/хв та коефіцієнт мікроциркуляції (коефіцієнт мікроциркуляції) в у.о. при ГІ, вивчали в межах проекції середньої мозкової артерії (СМА), рис. 2.2.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

Рис. 2.1. Загальний вигляд експерименту при оцінці функціональних показників в умовах внутрішньочерепного крововиливу електрофізіологічним обладнанням Biopaс (США), де: 1 – накладений датчик для виміру сатурації крові кинем; 2 –безконтактний (непрямий) вимір АТ; 3 – контактний (прямий) вимір АТ за допомогою п’єзо-датчика, під’єднаного до катетера, розміщеного в стегновій артерії; 4 – катетер в стегновій вені для реєстрації центрального венозного тиску; 5 – датчик для контролю частоти дихання; 6 – електроди для електрокардіографічного моніторингу; 7 – термокамера; 8 – конвектор

На місце трепанаційного отвору накладався датчик для реєстрації відповідних цифрових даних.

Аналогічним чином реєстрували зміни показника ступеня насичення крові киснем (SaO2, у % (рис. 2.3 (А)) в капілярах кори мозку за допомогою однойменного датчика Biopaс. АТ у мм.рт.ст., оцінювали непрямим (безкровним) методом на основі хвоста щура, зміни центрального венозного тиску (ЦВТ, мм водн.ст.), досліджували шляхом приєднання до канюлі катетера, який знаходився у правому передсерді, системи для в/в інфузій довжиною 5 см, яка заповнювалась 0,9 % розчином NaCl. Показник ЦВТ реєстрували у мм водного стовпчика за висотою рівня рідини в системі (нульовим рівнем слугувала lig. ingvinale), рис. 2.3 (Б). Катетеризацію правого шлуночка виконували через стегнову вену за методом Сельдінгера під контролем електрокардіограми (при торканні кінчиком катетера ендокарду відмічалась ескалація зубця Т). Правильність розташування катетерів у подальшому додатково верифікували на автопсії [10].

ВЧТ, в у.о, вимірювали тонометром ICARE (Фінляндія), рис. 2.4, через трепанаційний отвір в черепі, після послідовної реєстрації коефіцієнта мікроциркуляції та SaO2.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| А. Реестрація параметрів церебрального кровотоку | Б. Скрін-шот з монітору при записі функціональних показників |

Рис. 2.2. Загальний вигляд експерименту при оцінці параметрів церебрального кровотоку (А) та вивід і візуалізація значень функціональних показників на монітор (Б), де: 1 – датчик в проекції середньої мозкової артерії (А) та значення на моніторі (Б); 2 – накладений датчик для виміру сатурації крові кинем (А) та значення на моніторі (Б); 3 – значення артільного тиску при контактному способі виміру; 4 – значення центрального венозного тиску при контактному способі виміру; 5 – дані електрокардіограми в стандартних відведеннях

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| А. Скрін-шот з монітору із параметрами АТ та SaO2 | Б. Скрін-шот з монітору із параметрами центрального венозного тиску |
| В.Загальний вигляд електрофізіологічного обладнання Biopaс (США) | |

Рис. 2.3. ЕлектрофізіологічнеобладнанняBiopaс (США)

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\Admin\AppData\Local\Microsoft\Windows\INetCache\Content.Word\20150305_170753.jpg | Partec_PAS |
| А. Загальний вигляд тонометру ICARE (Фінляндія) | Б. Проточний цитометр PARTEC „PAS”, Німеччина |

Рис. 2.4. Обладнання для виміру внутрішньочерепного тиску (А) та протокові-цитометричного аналізу (Б)

Після стабілізації параметрів досліджуваних показників (через 20 хв. після маніпуляції) визначали їх вихідні (фонові рівні). Повторний вимір здійснювався наприкінці (4 доба).

## 2.3 Вибір, аналіз та обгрунтуваннядозового режиму та схем введення лікарських засобів нейропротекторної природи (адемолу та референс-препаратів)

Беручи до уваги той факт, що більшість пацієнтів із ГІ госпіталізується до спеціалізованого лікувального закладу у часовому інтервалі перших двох год з моменту виникнення судинно-мозкової події та особливості формування патогенетичних ланок інтракраніальноїгеморагії, терапевтичні заходи нейропротективної спрямованості стартували через 1 год після відтворення відповідної моделі САК, або ВМК.

Промисловий зразок адемолу, вводили з розрахунку 2 мг/кг в/в або в/о. За даними наших попередніх досліджень використання адемолу в такій дозі повною мірою забезпечувало реалізацію його нейропротективної активності при ішемічно-гіпоксичних ураженнях ЦНС не геморагічної природи, що верифікувалось зменшенням показника летальності та покращенням неврологічного статусу у щурів із різними підтипами інсульту.

В якості референс-препарату був обраний німодипін («Німотоп»«BayerHealthСare AG»;»Bayer AG», Німеччина), дозою 30 мкг/кг парантерально (в/о і в/в) у вигляді розчину, або його таблетована форма випуску з розрахунку 60 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) у вигляді суспензії, приготованої із додаванням Твіну-80 [132]. Даний лікарський засіб вибірково взаємодіє з кальцієвими каналами L-типу та блокує трансмембранний потік кальцію. Німодипін володіє виразними вазодилатуючими та протиішемічними властивостями, попереджаючи спазми церебральних судин викликані різними біологічно активними речовинами (серотоніном, простагландінами та інш.). Пероральний шлях введення є альтернативним і більш безпечним з точки зору можливої гіпотензії.

Зважаючи на рецепторну мішень адемолу, додатково, в якості препаратів-порівняння використовували блокатор поліамінового сайту NMDA-рецепторів розчин амантадину сульфат («ПК-мерц», МерцФарма, Німеччина), 10 мг/кг в/в; та іонотропний блокатор NMDA-рецепторів розчин магнію сульфата («Магнія сульфат-Дарниця» Дарниця, Україна), 250 мг/кг в/в. Референс-препарати застосовували в рекомендованих для доклінічних досліджень дозах [60, 133].

Тварини групи контрольної патології в якості терапії отримували фізіологічний розчин NаСІ у розрахунку 2 мл/кг.

Всі препарати вводили в/в у попередньо катетеризовану (катетер внутрішньовенній "УНОФЛОН" 22 G, Індія) стегнову вену за допомогою інфузоматної системи B. BraunMcGaw (Німеччина) упродовж 4 год (рис. 2.5). Під час інфузії, з метою профілактики гіпотермії, тварина знаходилась у вільному положенні у спеціальній термокамері (Biopaс, США), де за допомогою конвектора підтримувалась постійна температура в межах +180С – +200С (рис. 2.1).

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\Admin\AppData\Local\Microsoft\Windows\INetCache\Content.Word\IMG_8309.jpg |  |
| А. Етап постановки катетера (номер 22 G) у стегнову вену щура до його фіксації під шкірою | Б. Довенне введення досліджуваних розчинів у катетеризовану крайову вену вуха за допомогою інфузоматної системи B. Braun (Німеччина) |

Рис. 2.5. Етапи забезпечення довенного доступу для інфузії препаратів через інфузоматну систему

Введення препаратів за допомогою інфузоматної системи має низку переваг перед їх внутрішньоочеревинним застосуванням, зокрема створюється пікова концентрація препарату в крові, яка ідтримується у продовж певного тривалого проміжку (під час інфузії), що наближає умови проведення експериментальної фармакотерапії до клінічних. У випадку застосування німодипіну, згідно до інструкції-виробника, інфузоматна система була затемнена [132].

Досліджуваний препарат № 1. Адемол («Адемол-Дарниця», Дарниця, Україна, 10 ампул по 1 мл 1,0 % розчину, концентрацією 10 мг/мл).

Назва. Адемол-Дарниця

Фармакотерапевтична група. Засоби, що стимулюють пологову діяльність

Номер серії. 020414

Дата виготовлення. 01.04.2014

Склад. Діюча речовина: 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлорид; 1 мл розчину містить 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлорид 1мг

Допоміжніречовини: вода для ін’єкцій. Форма випуску. Розчин для ін’єкцій.

Умови зберігання. Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С. Не охолоджувати.

Зберігати в недоступному для дітей місці. Термін придатності – 3 роки.

Термін придатності: травень 2019 р.

Повна характеристика препарату наведена в сертифікаті якості № 00454.

Досліджуваний препарат № 2.Амантадину сульфат («ПК-Мерц», MerzPharmaceuticals, Німеччина), 1 флакон 500 мл концентрацією 200 мг/500 мл.

Назва. ПК-Мерц

Фармакотерапевтична група. Протипаркінсонічні препарати. Код [N04B B01](http://compendium.com.ua/atc/N04#N04B_B01).

Номер серії. 406191

Дата виготовлення. 11.06.2014

Склад. 500 мл розчину містить діючої речовини амантадину сульфату 200 мг та в якості допоміжної речовини хлорид натрію 4,725 г.

Форма випуску. Розчин для інфузій.

Умови зберігання. Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С. Не охолоджувати. Зберігати в недоступному для дітей місці.

Термін придатності – 5 років.

Термін придатності: травень 2019 р.

Повна характеристика препарату наведена в сертифікаті якості № 111353.

Досліджуваний препарат № 3. Магнію сульфат-Дарниця («Магнія сульфат-Дарниця», Дарниця, Україна, 10 ампул по 5 мл концентрацією 250 мг/мл.

Назва. Магнію сульфат-Дарниця

Фармакотерапевтична група. Додаткові розчини для внутрішньовенного введення. Магнію сульфат. Код [B05X A05](http://compendium.com.ua/atc/B05#B05X_A05)

Номер серії. 010115

Дата виготовлення. 01.01.2015 р.

Склад. Діюча речовина: Magnesiumsulfate; 1 мл розчину містить магнію сульфату гептагідрату 200 мг або 250 мг у перерахуванні на 100% суху речовину.

Допоміжніречовини: вода для ін’єкцій.

Форма випуску. Розчин для ін’єкцій.

Умови зберігання. Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С. Не охолоджувати. Зберігати в недоступному для дітей місці.

Термін придатності – 3 роки.

Термін придатності: лютий 2018 р.

Повна характеристика препарату наведена в сертифікаті якості № 111353.

Група контрольної патології отримувала 0,9 % розчин NаСІ із розрахунку 2 мл/кг парантерально. Псевдооперованих тварин піддавали всім втручанням (наркоз, розріз шкіри, кістково-пластична трепанація черепа) за виключенням маніпуляцій, які безпосередньо могли б призвести до травматичного ураження мозку, що нівелювало вплив травматичних умов експерименту. Їм також вводили еквівалентну кількість 0,9 % розчину NаСІ.

Референсний препарат № 4. 0,9 % розчин NаСІ, фізіологічний розчин натрію хлориду («Натрію хлорид-Дарниця», Дарниця, Україна).

Назва. Натрію хлорид-Дарниця.

Фармакотерапевтична група. [Плазмозамінні та дезінтоксикаційні розчини](http://mozdocs.kiev.ua/liki.php?nav=2&phgroup=99).

Код B05XA03.

Номер серії: 241016

Дата виготовлення: 24.10.2016 р.

Склад. Діючі речовини:1 мл розчину містить натрію хлориду 9 мг; допоміжна речовина: вода для ін’єкцій.

Форма випуску. Розчин для ін'єкцій 0.9% по 5 мл в ампулах № 10.

Умови зберігання. Зберігати при кімнатній температурі не вище 25 °С у місці, недоступному для дітей.

Термін придатності. 11.2021 р.

Повна характеристика препарату наведена в сертифікаті якості № 24 від 31.10.2016 р.

Референсний препарат № 5."Німотоп" "BayerHealthСare AG";"Bayer AG", Німеччина

Назва. Німотоп

Фармакотерапевтична група. Селективні блокатори кальцієвих каналів з переважним впливом на судини. Похідні дигідропіридину. Код  [АТС](http://likicontrol.com.ua/atc-%D0%BA%D0%BB%D0%B0%D1%81%D0%B8%D1%84%D1%96%D0%BA%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F/) С08С А06.

Номер серії: 050614

Дата виготовлення: 05.06.2014р.

Склад. Діючі речовини: 1 таблетка містить 30 мг німодипіну; *допоміжні речовини*: целюлоза мікрокристалічна, кросповідон, магнію стеарат, крохмаль кукурудзяний, повідон, заліза оксид жовтий (Е 172), макрогол 4000, гіпромелоза, титану діоксид (Е 171).

Форма випуску. Таблетки, вкриті плівковою оболонкою, по 30 мг №30, №100

Умови зберігання. Зберігати при кімнатній температурі не вище 25 °С у місці, недоступному для дітей.

Термін придатності. 05.2029 р.

Повна характеристика препарату наведена в сертифікаті якості№ 5 від 05.06.2014 р.

Референсний препарат № 6.Німотоп. «BayerHealthСare AG»; «Bayer AG», Німеччина

Назва. Німотоп

Фармакотерапевтична група. Селективні блокатори кальцієвих каналів з переважним впливом на судини. Похідні дигідропіридину. Код [АТС](http://likicontrol.com.ua/atc-%D0%BA%D0%BB%D0%B0%D1%81%D0%B8%D1%84%D1%96%D0%BA%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F/) С08С А06.

Номер серії: 131115

Дата виготовлення: 13.11.2015 р.

Склад. Діючі речовини: 1 флакон 50 мл містить 10 мг німодипіну.

Допоміжніречовини: спирт етиловий 96 %, макрогол 400, натрію цитрат, кислота лимонна безводна, вода для ін’єкцій.

Форма випуску. Розчин для інфузій по  50 мл у флаконі; по 1 флакону разом з поліетиленовою сполучною трубкою для інфузомата у картонній коробці, по 5 коробок в упаковці з поліетилену.

Умови зберігання. Зберігати при кімнатній температурі не вище 25 °С у місці, недоступному для дітей.

Термін придатності. 11.2021 р.

Повна характеристика препарату наведена в сертифікаті якості № 11 від 13.11.2015.

Моделювання ГІ та дослідження функціональних параметрів, оцінка динаміки виживаності тварин, неврологічного дефіциту у щурів і мнемотропної активності у препаратів, проводили на базі Науково-дослідна лабораторія доклінічного вивчення фармакологічних речовин (свідоцтво МОЗ України про переатестацію № 023/13 від 05.03.2013 р., свідоцтво про технічну компетентність №030/18 від 1 листопада 2018 р.. чинне до 31 жовтня 2023 р.), та ННДЛ «Фармадар» за допомогою д.мед.н., професора кафедри фармакології О.А. Ходаківського.

## 2.4. Загальна характеристика біохімічних, цитометричних та морфологічних (гістологічних) методів дослідження

Біохімічні дослідження виконані на базі кафедри біологічної та загальної хімії та Науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №049/15 від 02 березня 2015 р.). за сприянням д.мед.н., проф. Мельника А. В. Морфологічну оцінку мікропрепаратів та протоково-цитометричний аналіз проводився на базіНауково-дослідного центру функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №050/15 від 02 березня 2015 р.), за безпосередньої участі співробітника ст.н.с., к.мед.н., доц. кафедри очних хворобЧерешнюка І. Л (консультант з протоковоїцитометрії). Дисертантка всім зазначеним науковцям висловлює велику подяку.

За допомогою імуноферментного аналізу в сироватці крові тварин, використовуючи набор «NSE ELISA KIT» (DAI, США), визначали вміст нейронспецифічноїенолази (NSE; КФ 4.2.1.11), яка віддзеркалює у головному мозку нейродеструктивні та нейродегенеративні явища та рівень кортизолу за допомогою набору CORTISOLKIT (Німеччина). Аналогічним чином, за допомогою набору

«S 100 ELISA KIT» (FujirebioDiagnosticsInc., Швеція) визначали рівень білка S 100, що засвідчує інтенсивність нейропроліферативних змін. Сироватку добували опісля центрифугування крові, яку отримували із центральної вени (стегнової), шляхом прямої венопункції при 1600 g 10 хв за 19-21оС. Аліквоти сироватки елімінували в мікропробіркиЕрpendorf і зберігали при -25оС до проведення дослідження на приладі фірми "Hipson" (Чехія).

Динаміку біохімічних маркерів у головному мозку щурів виявляли в кінці най-гострішого та відновного періодів САК (4-та та 21-ша доба після моделювання па-тології) за методиками, загальний опис та посилання на які наведено у монографії [16].

Вміст пірувату та лактату визначали колориметричним методом [135].

Процес вільнорадикального окиснення характеризували за рівнем малонового діальдегіду (МДА) [136] та карбонільних груп протеїнів (КГП) [137]. Стан антиоксидантної системи верифікували за активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (ГПР).

Так, стан енергетичного та вуглеводного обмінів оцінювали за вмістом у головному мозку відповідно аденозинтрифосфорної (АТФ), аденозиндифосфорної (АДФ) кислот та АМФ лактату і пірувату. Вміст аденілових нуклеотидів визначали в безбілковому трихлороцтовому екстракті мозку 1:10 (10% розчин трихлороцтової кислоти) хроматографічним методом [134, 135]. Енергетичний заряд розраховували за відомою формулою:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Енергетичний заряд= | 2АТФ+АДФ | , | (2.1) |
| 2 (АТФ+АДФ+АМФ) |

де: АТФ – аденозинтрифосфорна кислота;

АДФ – аденозиндифосфорна кислота;

АМФ – аденозинмонофосфорна кислота

Активність супероксиддисмутази (СОД) оцінювали за відсотком гальмування окиснення кверцетину [138], а каталази – за швидкістю деградації гідроген пероксиду [139]. Активність глутатіонпероксидази визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисненого глутатіону[140].

Рівень L-аргініну визначали за реакцією Сакагучі [135].

Баланс у системі монооксиду азоту (NO ) описували шляхом визначення сумарної NO-синтазної активності [141].

Вміст глутамату визначали методом тонкошарової хроматографії [142].

Вмістзагального білка визначали мікробіуретовим методом з реактивом Бенедикта [143].

Для протоково-цитометричного аналізу на 4-ту добу (96 год) після відтворення ВМК мозок вилучався із черепної коробки, виконувалась двобічна лобектомія і для подальшого дослідження, трепаном із площею поперекового зрізу 1500 мкм елімінувалась кора. За затвердженим лабораторним протоколом, із забраного біоматеріалу при додаванні оригінальних реагентів СуStain DNA фірми Partec, (Німеччина) готували суспензію для подальшого протоково-цитометричного дослідження на однойменному цитометріPartec, (Німеччина). В автоматичному режимі виявляли два показника клітинного циклу, які виводились та виділялись на ДНК-гістограмах, а саме: фаза S – це відсоткове співвідношення фази синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2 c та < 4 c) та період SUB-G0G1 – це фрагментація ядерної ДНК (власно маркер апоптозу), що інтерпретується шляхом виділення ділянки RN1 на ДНК-гістограмах перед піком G0G1 і вказує на ядра клітин із вмістом ДНК < 2 с. Визначення ділянки S на ДНК-гістограмах, свідчить про проліферативну активність (нейрогліальну проліферацію), а розрахунок відсотка ядер із фрагментованою ДНК засвідчує апоптоз [144].

При підготовці біоматеріалу (лобні частки мозку та гіпокамп) для світлової мікроскопії їх екстрадували в тотожний термін та за аналогічною методикою, як і для протоковоїцитометрії, занурювали у 10 % нейтральний формалін (10-кратний об’єм відносно параметрів тканини) терміном не менш ніж на 7 діб та після стандартної гістологічної проводки заливали у парафін. [145]. На ротаційному мікротомі виготовляли та 5-мікронні поперекові зрізи, які депарафінували за стандартною методикою та забарвлювали за гематоксилін-еозином. Зображення отримували на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Германія) та за допомогою 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в комп’ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (KontronElektronik, Германія).

## 2.5 Методи статистичного аналізу

Отримані в ході наукового дослідження цифрові дані аналізували за допомогою статистичної програмного забезпечення StatPlus 2009. Результати наведено як М±m. Нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро-Уілка. В разі нормального розподілу для оцінки відмінностей показників використовували параметричний критерій t Ст’юдента, за відсутності такого – непараметричний критерій W Уайта, парний критерій Ť Вілкоксона – для верифікації значущих змін у динаміці всередині групи, точний коефіцієнт Фішера – при оцінці результатів в альтернативній формі [146, 147]. Статистично значущими вважали відмінності при р<0,05.

# РОЗДІЛ 3

**СКРИНІНГ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ АДЕМОЛУ В УМОВАХ РІЗНИХ ПІДТИПІВ ВНУТРІШНЬОЧЕРЕПНОГО КРОВОВИЛИВУ**

## 3.1. Апробація моделі субарахноїдального крововиливу у щурів, викликаного введенням у підпавутинний простір м'якої мозкової оболонки аутокрові для доклінічної оцінки потенційних церебропротекторів

Проведене дослідження показало, що у псевдооперованих щурів, яким в умовах пропофолового наркозу здійснювали трепанацію черепа за кістково-пластичною методикою (стереотаксичні координати проекції: Н=7,0 мм, L=3,0 мм, А=1,5 мм від брегми), летальність упродовж 4-х діб була відсутньою (табл. 3.1).

## Таблиця 3.1

Залежність летальності щурів із модельним субарахноїдальним крововиливом від об’єму крові введеній у підпавутинний простір (n=10)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Групи | Летальність, абс. / %, термін, год | | | | | |
| 24 | 36 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| І | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ІІ | 30º | 50º\*# | 60º\*# | 70º\*# | 80º# | 90º# |
| ІІІ | 10 | 30º | 30º | 40º | 70º | 70º |
| ІV | 0 | 20º | 20º | 40º | 50º | 70º |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно ІСАК-ої групи;
2. \* – р<0,05 відносно ІІІСАК-ої групи;
3. # – р<0,05 відносно ІVСАК-ої групи.
4. n – кількість тварин в групі

Це вказує на той факт, що оперативне втручання не призводить до порушення діяльності мозку та інших вітальних органів і систем, яке може призвести до смерті тварини. У щурів із моделлю САК, яка була викликана ін’єкцією через катетер у САП (трепанаційний отвір локалізувався у місці аналогічному до псевдооперованих тварин) гепаринізованоїаутокрові (0,1 мл/кг) упродовж перших двох діб відмічалось прогресуюче збільшення показника летальності: більше половини тварин (60%) загинуло у цей часовий проміжок, що можна вважати за критичний рубіж для даної патології. В подальшому цей показник зростав, і через 96 год (4-та доба, кінець спостереженння) становив 80 %, р<0,05. Зменшення об’єму введеної у підпавутинний простір аутокрові, закономірно знайшло своє віддзеркалення у виживаності щурів із моделлю САК. Так зменшення такого об’єму до 0,07 мл/кг, супроводжувалось вірогідними змінами у критичний період експерименту, коли показник летальності щурів був меншим відносно попередньої моделі в середньому на 30 %, р<0,05. Таке відсоткове співвідношення було закономірним і зберігалось наступні 24 год, маючи достеменний характер із вірогідністю 99,95 %.

Подальше зменшення об’єму введеної у підпавутинний простір аутокрові ще на 0,02 мл до 0,05 мл/кг, також призвело до зменшення летальності тварин із САК, що супроводжувалось зростанням виживаності щурів в середньому на 10 %. Однак, таке покращення не мало достеменних ознак, проявляючись в якості тенденції. У наступні строки спостереження подібна динаміка була незмінною, і лише на 4-ту добу виживаність зросла до 20 % проти ІІІ-ої групи, р>0,05.

Таким чином, за динамікою показника летальності, можна зробити попередній висновок, стосовно можливої класифікації ступеня важкості САК, який зростає від легкого до тяжкого в залежності від об’єму крові введеній у підпавутинний простір, відповідно від 0,05 до 0,1 мл/кг, табл. 3.2.

Паралельно здійснювалась розробка критеріїв оцінки величини та характеристики ступенів САК в залежності від об’єму крові введеній у підпавутинний простір за змінами активності в сироватці крові маркеру деструкції нейронів нейрон-специфічної енолази (NSE). Використана модель САК із оцінкою специфічного високочутливого маркеру, який віддзеркалює морфологічну цілісність нейронів, дозволить проводити екстраполяцію отриманих експериментальних даних на відповідну клінічну нозологію у людей. Це, у свою чергу, буде сприяти запровадженню в практичну медицину препаратів із нейроцитопротективною активністю для лікування геморагічних уражень головного мозку.

## Таблиця 3.2

Ранжування ступеня важкості субарахноїдального крововиливу

в залежності від летальності щурів в критичний період інсульту (48 год)

та від об’єму крові введеній у підпавутинний простір (n=10)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Об’єм крові | Групи | Ступінь важкості |
| 0 мл/кг | I | - |
| 0,05 мл/кг | II | легкий |
| 0,07 мл/кг | III | середній |
| 0.1 мл/кг | IV | тяжкий |

Примітка: n – кількістьтварин в групі.

Із літературних даних відомо, що активність енолази, починаючи з перших годин судинно-мозкової катастрофи, має тісний кореляційний зв'язок із летальністю (виживаністю) та неврологічним статусом (неврологічним дефіцитом) [149–151]. Чим вища активність NSE, тим важче перебігає інсульт, тим серйозніший прогноз у такому випадку (висока смертність, тривалі строки госпіталізації, значна інвалідизація).

Моніторинг активності NSE у щурів із САК ІІ-ої групи показав, що на другу добу після моделювання інсульту (критичний період), рівень енолазної активності достеменно виріс відносно тотожного показника у псевдооперованих тварин в середньому у 24,94 рази, що вказує на явище нейродеструкції, таб 3.3

Останнє добре співвідноситься із тим, що за показником летальності цей період є критичним у розвитку САК, а смертність перейшла позначку у 50 %.

Зменшення кількості введеної у підпавутинний простір аутокрові, закономірно знайшло своє віддзеркалення у деескалації активності енолази в сироватці крові щурів із моделлю САК. Так, регрес такого об’єму до 0,07 мл/кг, супроводжувався вірогідними змінами досліджуваного нейромаркера у критичний період експерименту, коли, його активність знизилась відносно ІІ-ої групи в середньому у 1,48 рази, р<0,05.

## Таблиця 3.3

Залежність активності нейрон-специфічної енолази

у щурів із модельним субарахноїдальним крововиливом

від об’єму крові введеній у підпавутинний простір

(48 год експерименту, критичний період), M±m, n=7

|  |  |
| --- | --- |
| Групи | Активність нейрон-специфічної енолази, нг/мл |
| І | 0,196±0,011 |
| ІІ | 4,889±0,139º\*# |
| ІІІ | 3,313±0,092º# |
| ІV | 2,259±0,084º |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно ІСАК-ої групи;
2. \* – р<0,05 відносно ІІІСАК-ої групи;
3. # – р<0,05 відносно ІVСАК-ої групи;
4. n – кількістьтварин в групі.

Подальше зменшення об’єму введеної у підпавутинний простір аутокрові ще на 0,02 мл до 0,05 мл/кг, призвело до зменшення сироваткової енолазної активності у тварин із САК відносно ІІІ-ої групи ще в середньому у 1,47 рази, р>0,05.

Таким чином, за активністю нейрон-специфічної енолази, можна зробити висновок, стосовно можливої класифікації ступеня важкості САК, який зростає від легкого до тяжкого в залежності від об’єму крові введеній у підпавутинний простір, відповідно від 0,05 до 0,1 мл, що вже було проілюстровано у табл. 3.2.

У критичний період експерименту, аналізуючи залежність активності NSE від об’єму крові введеній у підпавутинний простір, для наглядної демонстрації класифікації ступеня важкості САК, доцільним є побудова варіаційного ряду, в якому той об’єм аутокрові призводить до важчого ступеня інсульту, який знаходиться далі до значень ферменту у групі псевдооперованих тварин. Варіаційний ряд виглядає наступним чином: псевдооперовані щури >0,07 мл/кг (ІІІ-тя група, САК легкого ступеня важкості) >0,05 мл/кг (ІV-та група, САК середнього ступеня важкості) >0,1 мл/кг (ІІ-га група, САК тяжкого ступеня важкості).

Для повноцінної апробації такої моделі САК та класифікації ступенів її важкості в залежності від об’єму аутокрові, було доцільним, поряд із характеристикою виживаності тварин та енолазною активністю, дати оцінку змінам неврологічного статусу (дефіциту) щурів у критичний період експерименту (48 год).

Проведене дослідження показало, що значній летальності щурів із САК ІІ-ої групи відповідав важкий неврологічний дефіцит, оцінений в балах за шкалою С.Р. McGraw. У псевдооперованих тварин неврологічний статус без змін, що співпадає із стовідсотковою виживаністю. На противагу цьому, у щурів ІІ-ої групи 60-ти % летальності відповідав неврологічний дефіцит тяжкого ступеня важкості, який в балах в середньому становив 11,93 бали (табл. 3.4).

Зменшення кількості введеної у підпавутинний простір аутокрові, закономірно знайшло своє віддзеркалення у деескалації неврологічного дефіцитуза шкалою С.Р. McGraw. Так, регрес такого об’єму до 0,07 мл/кг, супроводжувався вірогідними зменшенням середньою суми балів до 6,53±0,33, що у 1,83 рази менше ніж в аналогічний період у ІІ-ій групі щурів із САК при р<0,05, і відповідає неврологічному статусу середнього ступеня важкості.

Подальше зменшення об’єму введеної у підпавутинний простір аутокрові ще на 0,02 мл до 0,05 мл/кг, призвело до додаткового вірогідного зменшення неврологічного дефіциту у тварин із САК відносно ІІІ-ої групи ще в середньому на 22,4 %, р>0,05, і відповідає неврологічному статусу легкого ступеня важкості.

В критичний період експерименту, аналізуючи залежність зменшення неврологічного дефіциту у тварин із САК від об’єму крові введеній у підпавутинний простір, для наглядної демонстрації класифікації ступеня важкості САК, як і для попередніх критеріїв, доцільним є побудова варіаційного ряду, в якому той об’єм аутокрові призводить до важчого ступеня інсульту, який знаходиться далі до значень ферменту у групі псевдооперованих тварин.

Таблиця 3.4

Залежність неврологічного дефіцитуза шкалою С.Р. McGraw

у щурів із субарахноїдальним крововиливом у критичний період інсульту

від об’єму крові введеній у підпавутинний простір

(48 год експерименту, критичний період), M±m (n=7)

|  |  |
| --- | --- |
| Групи | Бали за шкалою С.Р. McGraw |
| І | 0,0±0,0 |
| ІІ | 11,93±0,33º\*# |
| ІІІ | 6,53±0,33º# |
| ІVСАК (n=7) | 5,07±0,28º |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно І-ої групи;
2. \* – р<0,05 відносно ІІІ-ої групи;
3. # – р<0,05 відносно ІV-ої групи;
4. n – кількістьтварин в групі.

Отож, варіаційний ряд виглядає наступним чином: псевдооперовані щури >0,07 мл/кг (ІІІ-тя група, САК легкого ступеня важкості) >0,05 мл/кг (ІV-та група, САК середнього ступеня важкості) >0,1 мл/кг (ІІ-га група, САК тяжкого ступеня важкості).

Зважаючи на той факт, що головний мозок знаходиться у замкненій черепній коробці, будь-які зміни у ліквородинаміці (підвищення або зменшення об'єму циркулюючого ліквору) можуть призвести до зміщення та стискання його основних структур (бічних шлуночків, вклинення довгастого мозку у великий потиличний отвір, тощо). Описаний процес є вторинним альтеруючим фактором, котрий може самостійно впливати на прогноз у таких хворих з ВЧК. В умовах інсульту, особливо САК, лікводинаміка змінюється у бік наростання ВЧТ, напряму, через кров, яка потрапляє у підпавутинний простір, або опосередковано, при просякненні речовини мозку при ВМК. За рахунок появи згустків крові у підпавутинному просторі формуються септи, різко погіршується крово- та лікворобіг і наростає показник ВЧТ та розвивається набряк-набухання головного мозку.

За співвідносністю між об’ємом крові у САП та змінами ВЧТ можна охарактеризувати модель САК за різними ступенями важкості, що і було зроблено та описано нижче. Моніторинг значень ВЧТ у щурів із САК ІІ-ої групи показав, що на другу добу після моделювання інсульту (критичний період), абсолютні цифри досліджуваного показника вірогідно зросли відносно тотожних значень у псевдооперованих тварин в середньому у 3,83 рази, що, очевидно супроводжується суттєвим набряком-набуханням мозку, табл. 3.5.

## Таблиця 3.5

Залежність показника внутрішньочерепного тиску у щурів

із модельним субарахноїдальним крововиливом від об’єму крові, введеній

у підпавутинний простір (48 год експерименту, критичний період), M±m (n=7)

|  |  |
| --- | --- |
| Дослідні групи | ВЧТ (у. о.) |
| І | 4,286±0,0421 |
| ІІ | 16,429±0,571 º\*# |
| ІІІ | 10,571±0,429 º# |
| ІV | 7,571±0,369 º |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно ІСАК-ої групи;
2. \* – р<0,05 відносно ІІІСАК-ої групи;
3. # – р<0,05 відносно ІVСАК-ої групи;
4. n – кількістьтварин в групі.

Останнє добре співвідноситься із тим, що за показником летальності цей період є критичним у розвитку САК, смертність перейшла позначку у 50 %, сформувався неврологічний дефіцит важкого ступеня тяжкості, а енолазна активність (маркер нейродеструкції або нейроцитолізу) зросла майже у 30 разів.

Зменшення кількості введеної у підпавутинний простір аутокрові, закономірно знайшло своє віддзеркалення у деескалації показників ЧМТ у щурів із моделлю САК. Так, регрес такого об’єму до 0,07 мл/кг, супроводжувався вірогідними змінами досліджуваного показника у критичний період експерименту, коли, його рівень знизився відносно ІІ-ої групи в середньому у 1,55 рази, р<0,05. Подальше зменшення об’єму введеної у підпавутинний простір аутокрові ще на 0,02 мл до 0,05 мл/кг, також додатково призвело до зменшення значень ВЧТ у тварин із САК відносно ІІІ-ої групи в середньому у 1,4 рази, р<0,05.

Таким чином, за зміною показника ВЧТ у тварин із ВЧК можна зробити висновок, стосовно можливої класифікації ступеня важкості САК, який зростає від легкого до тяжкого в залежності від об’єму крові введеній у підпавутинний простір, відповідно від 0,05 до 0,1 мл, що вже було проілюстровано у табл. 3.2.

Аналізуючи залежність показника ВЧТ від об’єму крові, введеній у підпавутинний простір, для демонстрації класифікації ступеня важкості САК у критичний період експерименту, доцільним є побудова варіаційного ряду, в якому той об’єм аутокрові призводить до важчого ступеня інсульту, який знаходиться далі до значень ферменту у групі псевдооперованих тварин. Отож, варіаційний ряд виглядає наступним чином: псевдооперовані щури > САК 0,05 мл/кг (ІV-та група, САК легкого ступеня важкості) > САК 0,07 мл/кг (ІІІ-тя група САК середнього ступеня важкості) >0,1 мл/кг (ІІ-га група, САК тяжкого ступеня важкості).

Таким чином, модель САК у щурів, яка диференціюється по важкості на три ступеня в залежності від об’єму крові введеній у підпавутинний простір головного мозку, являє собою раціональну, валідизовану систему для первинного скринінгу перспективних нейропротекторів, що за сукупністю критеріїв (летальність (виживаність), неврологічний дефіцит, нейромаркерна активність, коливання ВЧТ) дає змогу всебічно та ґрунтовно оцінити їх ефективність [130, 152, 153].

## 3.2. Вплив адемолу на виживаність щурів із модельним внутрішньочерепним крововиливом

Дані, стосовно динаміки показника летальності щурів після введення аутокрові у САП у групі контрольної патології (в якості терапії використали фізіологічний розчин NаСІ) та при використанні препаратів, котрі традиційно розглядаються в площині нейропротекції, а також за умови терапії тварин із САК ампульним 1,0 % розчином адемолу, представлені у табл. 3.6.

Таблиця 3.6

Порівняльний вплив ефективності адемолу в різному діапазоні доз та шляхах введення, німодипіну, амантадину та магнію сульфату на динаміку летальності щурів із модельним субарахноїдальним крововиливом (n=10)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Дослідні групи | Летальність, %, термін, год | | | | | | |
| 24 | 36 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| Псевдооперовані щурі | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| САК + 0,9 % р-н NаСІ, 2 мл/кг (контрольна патологія) | 30º | 50 º | 70 º | 70 º | 80 º | 90 º |
| САК + адемол, 1 мг⁄кг в/в | 10 | 30º # | 40 º | 40º \*# | 70 º | 70 º |
| САК + адемол, 2 мг⁄кг в/в | 0 | 10\*# | 10\*#α&1,5 | 40º \*# | 40º \*# | 60º \*# |
| САК + адемол, 5 мг⁄кг в/в | 10 | 40 º | 40 º | 40º \*# | 60 º | 70 º |
| САК + адемол, 5 мг⁄кг в/ш | 10 | 40 º | 40 º | 40º \*# | 50 º\* | 70 º |
| САК + адемол, 10 мг⁄кг в/ш | 0 | 10\*# | 10\*#α&1,5 | 40º \*# | 50º\* | 70º |
| САК + адемол, 15 мг⁄кг в/ш | 10 | 30º # | 40 º | 50º \*# | 70 º | 70 º |
| САК + німодипін, 30 мкг/кг в/в | 0 | 20\*# | 40º \*# | 40º \*# | 50 º\* | 70 º\*# |
| САК + німодипін, 60 мг/кг в/ш | 0 | 20\*# | 40º \*# | 40º \*# | 40 º\*# | 60 º\*# |
| САК+амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 0 | 20\*# | 40º \*# | 40º \*# | 50º \* | 80º |
| САК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг | 20 | 60 º | 60 º | 70 º | 70 º | 90 º |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;

3. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);

4. α – р<0,05 відносно німодипіну (30 мкг/кг в/в);

6. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг в/о);

7. 1 – р<0,05 відносно адемолу дозою 1 мг/кг;

8. 5 – р<0,05 відносно адемолу дозою 5 мг/кг;

9. n – кількістьтварин в групі.

Як засвідчують отримані результати, в умовах модельного САК адемол, так само, як і амантадину сульфат або німодипін, є носіями церебропротекторної активності, на що вказувало вірогідне зниження на тлі їх в/в інфузії показника летальності щурів відносно тварин групи контрольної патології.

В останньому випадку (група контрольної патології), вже наприкінці першої доби після моделювання патології, зареєстрована летальність (30 %), котра носила достеменний характер та різнилась із групою псевдооперованих щурів, де смертність конкретно у даний часовий проміжок, а також в динаміці, не відмічалась.

Загалом, відсутність мортальних випадків після проведення оперативного втручання без послідуючого введення у САП ауто крові (група псевдооперованих щурів) вказує на гарну валідизацію методики та відсутність інтра- та післяопераційних ускладнень, зокрема гнійно-септичних, як найбільш частих при гострому досліді, супряженому із операцією.

Також відтворення САК в експериментальних умовах, яке було використано у даному дослідженні з мануальної та методологічної точки зору, є помірно складним, що дозволяє упродовж короткого проміжку часу (операційний світловий день) виконати значну кількість втручань, що є головним критерієм при формуванні дизайну при плануванні скринінгу (масовість експерименту та велика кількість тварин у групах). Таким чином, обрана методика відповідає вимогам з виявлення нових фармакодинамічних аспектів у лікарських засобів та біологічно-активних речовин [154].

В наступний часовий проміжок після початку моделювання САК (36 год), у групі контрольної патології загинуло половина всіх дослідних тварин, із яких було сформовано цю групу (50 %), а вже станом на кінець другої доби експерименту (48 год) смертність була в межах 70 %, що перевершувало 50 % відсоткову позначку. Це можна вважати критичним часовим проміжком у розвитку даного патологічного стану і періодом, з яким варто порівнювати ефективність досліджуваних церебропротекторів.

На кінець п’ятої доби експериментального ВЧК по типу САК у групі контрольної патології залишилось 20 % тварин (80 % летальності).

Таким чином, дана модель супроводжується низькою виживаностю щурів із модельним ГПМК, що вказує на тяжкий перебіг даного типу інсульту та робить таку модель адекватною та репрезентативною для скринінгу перспективних церебропротекторів. Проте, використання такого методологічного підходу для послідуючого поглибленого вивчення механізмів, котрі лежать в основі захисного впливу обраних препаратів на мозок, ускладнено через значну летальність, що робить неможливим формування групи контрольної патології після п’ятої доби. Навіть станом на 96 год (четверта доба), внаслідок виживаності лише в межах 20 %, добрати групу тварин в кількості достатній для послідуючої адекватної статистичної обробки отриманих результатів важко, необхідно мати велику вибірку, вводити в експеримент додаткових щурів і даний термін є останнім, коли це зробити все ще можливо.

Потужні, якісно відмінні при р<0,05 від усіх референсних препаратів (німодипін, амантадину та манію сульфат) нейропротекторні властивості продемонстрував адемол дозою 2 мг/кг довенно.

Так, у критичний період експерименту (36 год), коли у групі контрольної патології загинуло більше половини тварин з експериментальним інсультом (70 %) летальність на тлі в/в інфузіїадемолу становила 10 %. Курсове введення адемолу упродовж п’яти діб з моменту відтворення патології дозою 2 мг/кг забезпечило зменшення леталь-ності щурів в кінці терміну спостереження відносно групи контрольної патології в середньому на 40 % (р<0,05). Застосування з лікувальною метою адемолу дозами 1 та 5 мг/кг в/в виявилось достеменно менш ефективним порівняно із дозою 2 мг/кг.

Водночас варто зауважити, що адемол дозами 1 або 5 мг/кг на 36 год САК, також сприяв вірогідній деескалації летальності тварин в середньому на 30 %, достеменно поступаючись попередній дозі за виживаністю на третину (30 %). На п’яту добу інсульту, наприкінці терміну спостереження (120 год), введення адемолу дозами відповідно 5 та 1 мг/кг, хоча і супроводжувалось зменшення смертності тварин із САК відносно контролю, однак воно, на відміну від ефекту, який мав місце на тлі дози 2 мг/кг виявилось не достеменним (р>0,05).

Таким чином, аналізуючи ступінь зниження летальності щурів із САК на тлі в/в інфузіїадемолу в різному діапазоні доз (1, 2 або 5 мг/кг) за цим критерієм можна зробити висновок, що найбільш виразна деескалація показника смертності тварин із даною патологією мало місце саме при його застосуванні саме дозою 2 мг/кг, яку можна вважати умовно-ефективною. Такою дозою, адемол за своїм фармакодинамічнимнейропротективним проявом (підвищення виживаності) вірогідно переважав німодипін і розчини амантадину та магнію сульфату в середньому на 30, 30 та 50%. Обидва згадані референсні препарати мали схожий профіль виживаності упродовж усього терміну спостереження і вірогідних відмінностей між собою у виживаності на тлі їх використання не виявлено. Так, у критичний період інсульту (48 год) летальність виявилась в межах 40 %, яка є достовірно вищою ніж на тлі адемолу умовно-ефективною дозою 2 мг/кг в середньому на 30 %. В подальші строки, нарізна терапія модельного інсульту обома препаратами порівняння мала аналогічну до критичного періоду картину, поступаючись адемолу в середньому на 10–20 %, при р>0,05. Останній, за своєю перевагою до кінця спостереження так і не сягнув вірогідної різниці.

За критерієм виживаності, порівняно із іншим референсом – розчином магнію сульфатому, достеменна різниця мала місце на тлі адемолу, так само як і при терапії амантадином або німодипіном, що проявилось, починаючи з 36 год спостереження.

Подібна перевага вказаних нейропротекторів над магнієм сульфату зберігалась упродовж 72 год спостереження, після цього, в наступні часові проміжки їх дія мала відмінності. Так, в/в інфузіяадемолу забезпечила достеменні переваги над магнієм сульфатом, то розчин амантадину сульфату після третьої доби таких відмінностей не проявляв, а німодипін їх втратив на 96 год та знову їх набув вже вкінці спостереження.

Аналізуючи показник летальності в критичний період експерименту, для демонстрації величини церебропротекторної активності адемолу умовно-ефективною дозою 2 мг/кг та обраних референсів, доцільним є побудова варіаційного ряду в якому той препарат проявляє найбільший захисний вплив на головний мозок, який знахо-диться ближче до групи псевдооперованих тварин: варіаційний ряд виглядає на-ступним чином: псевдооперовані щури>адемол>німодипін=амантадину сульфат> магнію сульфат.Модельна інтрацеребральнагеморагія середнього ступеня важкості упродовж перших 4-х діб експерименту супроводжувалась прогресуючим зростанням показника летальності щурів. Отримані результати співпадають із даними, що були встановлені іншими дослідниками при вивченні впливу різних об’ємів інтра-церебрально введеної аутокрові на перебіг інсульту у щурів [127, 154–156] (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Порівняльний вплив ефективності внутрішньовенної інфузіїадемолу, амантадину та магнію сульфату на динаміку летальності щурів із інтрацеребральноюгеморагією середнього ступеня важкості

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Дослідні групи | Летальність, абс. / %, термін, год | | | | |
| 12 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| Псевдооперовані тварини+ 0,9% NаСІ (2 мл/кг) (n=30) | 0/0% | 0/0% | 0/0% | 0/0% | 0/0% |
| ІВМК + 0,9% NаСІ (2 мл/кг),  контрольна патологія (n=46) | 4/8,7% º | 8/17,4%º | 10/21,7% º | 12/26,1% º | 14/30,4% º |
| ІІВМК **+** адемол (2 мг⁄кг) (n=34) | 0/0% | 0/0%\*# | 0/0%\*#& | 2/5,9% º\*# | 4/11,8%º\*# |
| ІІІВМК + німодипін(30 мкг⁄кг) (n=38) | 0/0%\*# | 0/0%\*# | 3/7,9% º\*# | 4/10,5%º\*# | 5/13,2% º\* |
| IVВМК + амантадину сульфат (10 мг⁄кг) (n=47) | 0/0%\*# | 1/6,4%\*# | 4/8,5% º\*# | 7/21,1% º\* | 8/21,1% º |
| VВМК + магнію сульфат (250 мг⁄кг) (n=41) | 2/4,9% º | 6/14,6% º | 9/22% º | 10/24,4% º | 11/27,5% º |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

2.\* – р<0,05 відносно контролю;

3. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг в/о);

4. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг в/о);

5. n – кількістьтварин в групі.

Через 24 год після введення аутокрові показник летальності щурів із ВМК склав 17,4%, а на другу, третю та четверту добу відповідно 21,7; 26,1 та 30,4 %. У подальшому, впродовж наступних 17-ти діб спостереження (включно до 21-ої доби експерименту з моменту моделювання ВМК) летальність тварин не відмічалась.

Така динаміка летальності тварин із ВЧК: достатньо високий показник летальності на початку, та відсутність смертельних випадків у відновному періоді, дозволяє використовувати модель ВМК для поглибленої оцінки механізмів нейропротективної активності препаратів, що неможливо в умовах САК після четвертої доби, коли летальність в групі контрольної патології сягає 100 %.

Як видно із даних, представлених у табл. 3.2, при модельному ВМК усі досліджу-вані препарати, за винятком магнію сульфату, сприяли вірогідному зменшенню показника летальності тварин в умовах даного патологічного стану, що вказувало на наявність у них церебропротекторного ефекту. Однак, за величиною захисного впливу на ішемізований головний мозок вони мали певні якісні відмінності.

Як і на попередній моделі САК, найбільш потужні нейропротекторні властивості продемонстрував адемол та німодипін, забезпечуючи 100 % церебропротекторний захист упродовж перших 24 год (показник летальності у групах тварин, які отримували ці препарати дорівнював 0 % проти 17,4 % у контролі). Упродовж 48 год спостереження у щурів із ВМК, яким проводили терапію адемолом, не було відмічено жодного летального випадку, на відміну від лікування німодипіном та амантадином сульфатом, де смертність тварин з ВМК сягала відповідно 7,9 та 8,5 %. За величиною цребропротектрної дії в зазначений термін експериментального інсульту адемол дозою 2 мг/кг в/в вірогідно перевершував амантадину та магнію сульфат. Останній, проявив низьку ефективність упродовж усього терміну спостереження, що виявилось співвідносним із результати в умовах САК.

На нашу думку, така незадовільна церебропротекторна активність магнію сульфату може бути пов’язана із його фармакокінетичними особливостями, а саме коротким періодом напіввиведення. Останнє робить препарат дієвим лише під час інфузії. Припинення довенного застосування магнію сульфату, одразу супроводжується зникненням так званого «магнієвого блоку» кальцієвих каналів в мембранах нейронів, шоковим потраплянням іонів кальцію всередину нервових клітин та повторним формуванням глутаматноїексайтотоксичності. Для подовження фармакодинамічних ефектів магнію сульфату на головний мозок її необхідно застосовувати постійно, що досягається завдяки інфузоматної системи. Однак, такий підхід є неприпустимим в експериментальних умовах, оскільки застосування інфузомату можливо лише у знерухомлених тварин, що через короткий проміжок часу призводить до розвитку імобілізаційного стресу, який у тварин із високою руховою активністю, сам по собі може стати причиною летальності.

В наших дослідженнях ми проводили досить тривалу інфузію (4 год), поміщуючи тварину у спеціальний пенал «Biopac», де тварина знерухомлена частково і не заважає введенню препаратів у попередньо катетеризовану стегнову вену. Проте, тримати щура в пеналі згідно інструкції по його використанню можна не більше 4 год на добу односеансно, що і було дотримано. Адемол та німодипін також мають швидкісні фармакокінетичні параметри та короткий період напіввиведення, що диктує умови довготривалої та, бажано, постійної інфузії. Однак, на відміну від розчину магнію сульфату, припинення їх інфузії не супряжено із зникненням церебропротекторної активності та реверсом глутаматноїїексайтотоксичності, оскільки вже перше введення формує довготривалий стійкий захист мозку від дії патогенетичних чинників характерних для гострої церебральної ІР, які не обмежені лише активацією NMDA-рецепторів.

Станом на 48 год експерименту, базуючись на показниках виживаності щурів із ВМК, за спроможність зменшувати летальність тварин, а значить і ступенем церебропротекторної активності варіаційний ряд виглядає наступним чином: псевдооперовані щури >адемол = німодипін>амантадину сульфат > магнію сульфат. Курсова інфузія упродовж чотирьох діб ВМК розчинів адемолу та німодипіну, на відміну від амантадину або магнію сульфату, забезпечила вірогідне зменшення летальності щурів в кінці терміну спостереження відносно тварин групи контрольної патології в середньому відповідно на 88,2 та 86,2 % (р<0,05).

## 3.3. Дослідження неврологічного дефіциту у щурів із гострим порушенням мозкового кровообігу за геморагічним типом під впливом адемолу та референс-препаратів із подальшою оцінкою його мнемотропної активності

На першому етапі, провели оцінку неврологічного дефіциту в критичний період (48 год) при САК, коли летальність становила більше 50 % у групі контрольної патології. До кожної групи увійшло по 7 тварин, котрі вижили станом на даний часовий проміжок. (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Вплив адемолу та референс-препаратів на неврологічний дефіцитз

а шкалою С.Р. McGraw у щурів із субарноїдальним крововиливом

у критичний період інсульту, M±m (n=7)

|  |  |
| --- | --- |
| Групи тварин | Бали за шкалою  С.Р. McGraw, 48 год (критичний період САК) |
| Псевдооперовані тварини+ 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 0,0±0,0 |
| САК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг  (група контрольної патології) | 11,93±0,33º |
| САК **+** адемол, 2 мг⁄кг | 5,73±0,19º\*#&α |
| САК + німодипін, 30 мкг⁄кг | 7,0±0,17º\*# |
| САК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 7,73±0,21º\*# |
| САК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг | 10,0±0,24 º |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

2.\* – р<0,05 відносно контрольної патології;

3. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);

4.α – р<0,05 відносно німодипіну (30 мкг⁄кг);

5. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг).

За умов, коли тварин за результатом первинного скринінгу при оцінці летальності у попередній серії дослідів не вистачало до необхідної кількості (наприклад, група контролю), додатково залучали щурів, яким окремо аналогічно моделювали САК.

Проведене дослідження показало, що значній летальності щурів із САК відповідав важкий неврологічний дефіцит, оцінений в балах за шкалою С.Р. McGraw, яка є аналогом шкали Глазго в клінічних умовах при виявленні неврологічного статусу у хворих із інсультом.

У псевдооперованих тварин неврологічний статус залишався без змін, що співпадає із стовідсотковою виживаністю. На противагу цьому, у щурів групи контрольної патології 70-ти % летальності відповідав неврологічний дефіцит тяжкого ступеня важкості, який в балах становив 11,93 бали (табл. 3.7).

Терапія всіма досліджуваними препаратами сприяло вірогідному послабленню проявів неврологічного дефіциту, відносно групи контрольної патології. Навіть терапія САК розчином магнію сульфату, при якій летальність не різнилась від такої в групі контролю зменшувала середній бал за шкалою С.Р. McGraw на 1,93, що є достовірним при р<0,05. У порівнянні з іншими референсами, найменша неврологічна симптоматика мала місце на тлі адемолу умовно-ефективною дозою 2 мг/кг, коли при виживаності рівній 90 % дефіцит за обраною шкалою становив 5,73 бали, що у, 2,1 рази менше ніж у групі контрольної патології. На тлі амантадину сульфату та німодпіну, при однаковій смертності в критичний період рівній 30 %, неврологічний дефіцит також не мав достеменних відмінностей, проте був меншим відносно контролю в середньому у 1,54 та 1,70 рази, р<0,05. Порівняно з ними, адемол мав вірогідну перевагу у менших балах за шкалою С.Р. McGraw, які виявились нижчими порівняно із німодипіном та амантадином сульфатом у середньому відповідно в 1,22 та 1,35 рази, р<0,05.

У наступній серії дослідів, введення щурам у внутрішню капсулу головного мозку аутокрові з розрахунку 20 мкл/100 г, супроводжувалось змінами у неврологічному статусі, які за шкалою С.Р. McGrawвідповідали невролічній симптоматиці сере-днього ступеня важкості із максимальним проявом на 4-ту добу спостереження. Так, у цей термін спостереження у групі тварин із ВМК, яким уводили лише фізіологічний розчин NaCl (контрольна патологія), середній бал за шкалою С.Р. McGraw складав 7,33, що відповідає середньому ступеню неврологічног дефіциту (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Вплив адемолу та референс-препаратів на динаміку неврологічного дефіцитуза шкалою С.Р. McGraw у щурів із внутрішньомозковим крововиливом у гострий та відновний періоди інсульту (M±m, n=15)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Групи тварин | Бали за шкалою С.Р. McGraw | |
| Термін (доба) | |
| 4 | 21 |
| Псевдооперовані тварини+ 0,9% NаСІ,  2 мл/кг | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 |
| ВМК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг  (група контрольної патології) | 7,33±0,32º | 4,80±0,23º |
| ВМК **+** адемол, 2 мг⁄кг | 4,33±0,26º\*#& | 2,73±0,21º\*#& |
| ВМК + німодипін, 30 мкг⁄кг | 4,13±0,28º\*#& | 2,87±0,22º\*#& |
| ВМК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 5,13±0,20º\*# | 3,66±0,19º\*# |
| ВМК + магнію сульфат,250 мг⁄кг | 7,07±0,33º | 4,13±0,17º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

2.\* – р<0,05 відносно контрольної патології;

3. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);

4. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг).

Спостереження на 21-шу добу показали, що у щурів не відмічено повноцінне відновлення втрачених функцій ЦНС. На користь такого твердження, по-перше, вказував наявний неврологічний дефіцит (4,8 бали).

По-друге, дослідження процесів пам’яті та навчання на 21-шу добу ГПМК за критерієм зменшення латентного періоду входу до темної камери, де тварини напередодні зазнавали електробольового подразнення свідчать про пригнічення мнестичних функцій, про що мова йтиме далі (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Вплив адемолута референс-препаратів нанавчання та пам'ять щурів

ізвнутрішньомозковим крововиливому відновний період інсульту

за тестом умовної реакції пасивного уникнення (M±m, n=15)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Групи тварин | Латентний період входу в темну камеру, с | |
| до навчання | через 24 год після навчаня |
| Псевдооперовані тварини+  0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 5,47±0,36 | 219,27±2,12 |
| ВМК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг  (група контрольної патології) | 20,67±0,63 | 42,86±0,95º |
| ВМК **+** адемол, 2 мг⁄кг | 9,73±0,34º\*#α& | 125,53±2,37º\*#α& |
| ВМК + німодипін, 30 мкг⁄кг | 11,2±0,53º\*#& | 107,8±2,34º\*#α& |
| ВМК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 13,00±0,40º\*# | 103,00±3,97\*#& |
| ВМК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг | 16,0±0,43º\* | 70,47±1,96º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

3.\* – р<0,05 відносно контрольної патології;

4. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);

5.α – р<0,05 відносно німодипіну (30 мкг⁄кг);

6. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг).

Експериментальне лікування щурів із ВМК адемолом, як і референсними препаратами, сприяла покращенню неврологічного статусу вже на 4-ту добу церебральної ІР (табл. 3.4).

Аналізуючи динаміку регресу неврологічного дефіциту, можна відзначити, що у ранній період ГПМК адемол вірогідно переважав ефективність амантадину і магнію сульфату, співставляючись при цьому з німодипіном: на 4-ту добу спостереження середній бал за шкалою С.Р. McGraw становив 4,33 проти 5,13; 7,07 та 4,13 (р<0,05).

Отже, у зазначений період за деескалацією балів, адемол вірогідно перевершував ефективність амантадину і магнію сульфату в середньому у 1,18 та 1,63 рази, а варіаційний ряд виглядає наступним чином: псевдооперовані щури >адемол = німодипін>амантадину сульфат > магнію сульфат.

У відновлювальному періоді модельного ВМК (21-ша доба), як і на 4-ту добу, препаратами лідерами виявились адемол та німодипін, котрі продемонстрували однакову спроможність знижувати неврологічну симптоматику – середній бал за шкалою С.Р. McGraw становив відповідно 2,73 та 2,87 проти 4,80 у групі контролю та 3,66 і 4,13 на тлі введення амантадину та магнію сульфату (табл. 3.8).

## Висновки до розділу 3

1. Апробовано модель для первинного скринінгу перспективних нейропротекторів, що за сукупністю критеріїв (летальність (виживаність), неврологічний дефіцит, нейромаркерна активність, параметри ВЧТ), дає змогу в критичний період інсульту (48 год) залежно від об’єму крові введеній у підпавутинний простір головного мозку щурів класифікувати САК на три ступеня важкості: тяжкий ступінь (0,1 мл/кг аутокрові) – смертність 70 %, активність NSE 4,889±0,139 нг/мл, неврологічний дефіцит за шкалою С.Р. McGraw 11,93±0,33 бали, ВЧТ 16,429±0,571 у.о; середній ступінь (0,07 мл/кг аутокрові) – смертність 30 %, активність NSE 3,313±0,092 нг/мл, неврологічний дефіцит 6,53±0,33 бали, ВЧТ 10,571±0,429 у.о.; легкий ступінь (0,05 мл/кг аутокрові) – смертність 20 %, активність NSE 2,259±0,084 нг/мл, неврологічний дефіцит 5,07±0,28 бали, ВЧТ 7,571±0,369 у.о.
2. При експериментальному САК тяжкого ступеня важкості застосування 1,0 % розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемол) у дозах 1, 2 та 5 мг/кг сприяло зменшенню у критичний період інсульту показника летальності щурів відносно групи контрольної патології в середньому на 30, 60 та 30 %, що ідентифікує умовно-ефективну терапевтичну дозу на рівні 2 мг/кг довенно, у якій препарат за своєю ефективністю (підвищення виживаності) вірогідно переважав німодипін і розчини амантадину та магнію сульфату в середньому на 30, 30 та 60 %, що вказує на перспективність і доцільність подальшої доклінічної оцінки його церебропротекторних властивостей.
3. На тлі терапії адемолом дозою 2 мг/кг довенно у критичний період САК тяжкого ступеня важкості при виживаності щурів рівній 90 % неврологічний дефіцит за шкалою С.Р. McGraw був у 2,1 рази меншим ніж у групі контрольної патології, демонструючи за сумою балів вірогідну перевагу досліджуваного похідного адамантану над німодипіном та амантадином сульфатом у середньому відповідно в 1,22 та 1,35 рази (р<0,05). У відновний період ВМК середнього ступеня важкості (21-ша доба) за ступенем деескалації неврологічної симптоматики адемол вірогідно переважав ефективність розчинів амантадину та магнію сульфату в середньому у 1,34 та 1,51 рази відповідно, виявляючи при цьому мнемотропну активність достеменно кращу за усі референс-препарати, покращуючи показники у тесті умовної реакції пасивного уникання.

# РОЗДІЛ 4

**ОЦІНКА ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ АДЕМОЛУ**

**ЗА ПОКАЗНИКАМИ ЕЛЕКРОФІЗІОЛОГІЧНИХ**

**ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН**

## 4.1. Динаміка змін параметру об’ємної швидкості мозкового кровотоку в центральній мозковій артерії у щурів із субарахноїдальним крововиливом на тлі інфузії розчинів адемолу або німодипіну

Метою даної експериментальної серії було з’ясувати наявність та провести порівняльну оцінку величини стимулювального впливу у промислового зразка 1,0 % розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемолу) та німодипіну на кровоплин в СМА щурів при САК.

Як і при оцінці неврологічного дефіциту, до кожної групи увійшло по 7 тварин, котрі вижили станом на даний часовий проміжок. За умов, коли тварин за результатом первинного скринінгу при оцінці летальності у попередній серії дослідів не вистачало до необхідної кількості (наприклад, група контролю), додатково залучали щурів, яким окремо аналогічно моделювали САК.

Результати, отримані в ході моніторингу ОШМК в умовах геморагічного інсульту, вказують на те, що вже через годину після введення аутокрові у САП, рівень кровоплину по СМА у всіх групах тварин знизився відносно початкового в середньому на 43–47 % (табл. 4.1). Це, по-перше, свідчить про адекватність обраної моделі інсульту, а по-друге – про інтенсивне формування зони із зниженою перфузією. Починаючи з другої доби геморагії, зниження мозкової перфузії відбувається не тільки за рахунок зовнішньої компресії судин гематомою та набряклою нервовою тканиною, а й завдяки дії вазоконстрикторних чинників. Ця теза знайшла підтвердження і в наших дослідженнях.

У вказаний період САК, церебральна гемодинаміка продовжувала погіршуватись, однак такого різкого «обвалу перфузії», яке мало місце в перші 24 год, не відмічалось.

Таблиця 4.1

Динаміка об’ємної швидкості мозкового кровоплинув середній мозковій артеріїу щурів ізсубарахноїдальним крововиливом за даними лазерної доплерографії на тлі окремої інфузіїадемолу та німодипіну, М±m (n=7)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Термін спостереження, год | Контрольна патологія | | | Німодипін (30 мкг/кг) | | | Адемол (2 мг/кг) | |
| мл/хв | зміни, % | мл/хв | | зміни, % | мл/хв | | зміни, % |
| Вихідний стан ОШМК | | | | | | | | |
| – | 6,40±0,01 | – | 6,38±0,01# | | – | 6,54±0,10 | | – |
| Динаміка ОШМК після моделювання САК через | | | | | | | | |
| 1 | 3,61±0,05\* | -43,6 | 3,51±0,05\*# | | -45,0 | 3,45±0,05\*# | | -47,3 |
| 24 | 3,39±0,05\* | -47,1 | 4,31±0,06\*# | | -32,5 | 4,11±0,06\*α# | | -37,2 |
| 48 | 3,24±0,04\* | -47,4 | 4,76±0,04\*# | | -25,4 | 4,45±0,07\*α# | | -32,0 |
| 72 | 3,08±0,03\* | -51,9 | 5,11±0,05\*# | | -19,9 | 4,73±0,08\*α# | | -27,7 |
| 96 | 3,01±0,01\* | -53,0 | 5,84±0,05\*# | | -18,5 | 5,07±0,06\*α# | | -22,5 |

Примітки:

1. \* – р<0,05 відносно вихідного стану в середині групи;
2. # – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. α – р<0,05 відносно німодипіну.
4. n – кількість тварин в групі.

Так, наприкінці 4-ої доби після моделювання САК показник ОШМК був вірогідно нижчим відносно вихідного стану в середньому на 53 %. Отже, введення щурам у САПаутокрові в об’ємі 0,1 мл/100 г упродовж усього гострого періоду інсульту (4 доби) супроводжується зниженням рівня мозкового кровоплину в СМА відносно вихідного стану більш ніж удвічі.

Адемол, як і німодипін, вже після одноразового введення (кінець першої доби) значно (відповідно на 27,1 % і 21,2 %, р<0,05 відносно групи контрольної патології) збільшували кровопостачання головного мозку щурів із САК через СМА. На 4-ту до-бу окремої терапії щурів із геморагічним інсультом адемолом, або німодипіном, кровоплин вірогідно збільшився відносно групи контрольної патології в середньому відповідно на 68,4 та 94,1 %.За величиною стимулювального впливу на мозкову гемо-динаміку адемол упродовж усього терміну спостереження, починаючи з першої доби, поступався референс-препарату в середньому на 4,8-15,2 % (р<0,05). Однак, у аде-молу є переваги перед німодипіном, одна з яких полягає у можливості викори-стовувати його для недиференційованої терапії ГПМК, як при ішемічному так і ВЧК.

Таким чином, результати досліджень свідчать, що в умовах модельного САК на тлі застосування промислового зразка 1,0 % розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемол) покращується об’ємний кровоплин через СМА. Ця властивість досліджуваного похідного адамантану, є важливою складовою та, очевидно, первинною ланкою його церебропротекторної дії в умовах САК.

## 4.2 Характеристика показників мікроциркуляції, центральної гемодинаміки та значень внутрішньочерепного тиску у тварин із різними підтипами геморагічного інсульту на тлі інфузії розчинів адемолу або німодипіну

Збереження достатнього кровоплинупо СМА, не є запорукою того, що на периферії на рівні капілярів в межах мікроциркуляторного русла кровообіг є задовільним. Причиною цього явища, найчастіше буває капіляростаз та сладж-феномен із подальшим тромбоутворенням. Тому доцільним є, поряд із оцінкою об’ємних гемодинамічних параметрів визначення змін кровоплину на рівні мікроциркуляторного русла, тобто в капілярах. Це твердження стосується як САК так і ВМК. Так, введення у внутрішню капсулу головного мозку аутокрові із розрахунку 20 мкл/100 г маси, що відповідає ВМК середнього ступеня важкості і це було підтверджено при оцінці нами неврологічного дефіциту у попередній дослідній серії, супроводжується значним погіршенням мікроциркуляції в судинах кори головного мозку, які відносяться до басейну СМА. На користь такого твердження вказує вірогідна, відносно початкового (фонового) рівня редукція значень коефіцієнту мікроциркуляції в середньому в 4,39 рази (табл. 4.2).

Аналогічні, однак ще більш виразні зміни у перфузії кори, відмічались на 4 добу САК. Так, в кінці досліду, коефіцієнт мікроциркуляції зменшився відносно початкових значень в середньому в 10,66 разу, р<0,05 (табл. 4.3).Оскільки, як за умов ВМК, так і при САК, гострий період інсульту (4-та доба), характеризується рефлекторним церебровазоспазмом – цей феномен можна вважати провідною причиною у формуванні дефіциту перфузії мозку. Друга, по значимості причина – безпосереднє перетискання гематомою судин ззовні. Особливо, це має ве-ликий сенс при САК, коли кров, яка потрапляє у САП, розповсюджуючись та змі-шуючись з ліквором, рівномірно тисне на кору та судини підпавутинного простору.Про ці фактори гіпоперфузії мова вже йшла у попередньому підрозділі 4.1, вплив інших чинників, що погіршують мозковий кровоплин, таких як колапс центральної гемодинаміки та ескалація ВМК, ми детально охарактеризуємо нижче.

Курсова довеннаінфузія щурам із модельним ВЧК 1,0 % розчину адемолу та референс-препарату німодипіну дозами відповідно 2 мг/кг та 30 мкг/кг, амортизувала падіння мозкової перфузії, стабілізуючи її рівень на коефіцієнтах мікроциркуляції в корі, більших за такі у групі контрольної патології в середньому в 3,99 та 2,76 рази (ВМК) і у 7,30 та 4,74 разу відповідно при САК, р<0,05 (табл. 4.2 та 4.3).

Однак, значення коефіцієнту не доходили до вихідних рівнів, і були меншими відносно фону на тлі адемолу при ВМК або САК в середньому на 16,6 та 36,3 %, а при введенні німодипіну відповідно на 38,1, або 57,9 %, р<0,05.При цьому, за обсягом стимулювальної дії на мікроциркуляцію в корі головного мозку басейну СМА, адемол вірогідно переважав німодипін при ВМК в середньому в 1,44, а при САК в 1,54 разу відповідно. Отже, маємо наявний дисонанс: німодипін ліпше за адемол покращує об’ємний кровоплин по СМА.

Таблиця 4.2

Зміни показників мікроциркуляції та ступеня насичення крові

в капілярах кори головного мозку щурів із внутрішньомозковим крововиливом, рівні артеріального і центрального венозного тиску, а також величини ескалації внутрішньочерепного тиску на 4-ту добу терапії

геморагічного інсульту адемолом (2 мг/кг), або німодипіном (30 мкг/кг), М±m, (n=7)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Термін спостереження (доба) | 0,9% розчин NaCl + ВМК (контрольна патологія) | Адемол + ВМК | Німодипін + ВМК |
| Коефіцієнт мікроциркуляції (у. о.) | Фоновий рівень | 11120,0±282,7 | 12084,0 ±403,4 | 11294,5±290,1 |
| 4 | 2529,8±70,8\* | 10081,5±177,4\*#α | 6985,7±240,1\*# |
| АТ (мм. рт. ст.) | Фоновий рівень | 120,8±2,3 | 119,5±2,4 | 118,0±1,1 |
| 4 | 78,5±0,4\* | 112,0±2,8# α | 90,2±1,4\*# |
| ЦВТ (мм вод. ст.) | Фоновий рівень | 80,5±1,0 | 83,3±1,3 | 84,7±0,8 |
| 4 | 53,8±1,0\* | 81,3±1,0# α | 76,3±0,8\*# |
| SaO2(%) | Фоновий рівень | 98,3±0,4 | 97,9±0,5 | 98,1±0,5 |
| 4 | 74,0±1,2\* | 90,7±0,4\*# α | 84,3±0,6\*# |

Примітки:

1. \* – р<0,05 щодо фонового рівня;
2. # – р<0,05 щодо групи контрольної патології;
3. α – р<0,05 щодо німодипіну;
4. n – кількість тварин в групі.

Таблиця 4.3

Зміни показників мікроциркуляції та ступеня насичення крові в капілярах кори головного мозку щурів

із субарахноїдальним крововиливом, рівні артеріального і центрального венозного тиску на 4-ту добу терапії геморагічного інсульту адемолом (2 мг/кг) або німодипіном (30 мкг/кг), М±m (n=7)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Термін спостереження (доба) | 0,9% розчин NaCl + САК (контрольна патологія) | Адемол + САК | Німодипін + САК |
| Коефіцієнт мікроциркуляції (у. о.) | Фоновий рівень | 11118,0±291,7 | 11946,6 ±403,4 | 11715,1±293,0 |
| 4 | 1042,0±45,4\* | 7607,1±121,1\*# α | 4937,0±58,6\*# |
| АТ (мм. рт. ст.) | Фоновий рівень | 118,7±1,6 | 120,3±2,3 | 120,1±1,1 |
| 4 | 62,3±1,1\* | 115,3±1,4# α | 82,1±1,2\*# |
| ЦВТ (мм вод. ст.) | Фоновий рівень | 80,7±0,8\* | 83,3±1,1 | 84,0±1,3 |
| 4 | 43,3±1,5 | 80,7±0,7# α | 68,7±0,8\*# |
| SaO2(%) | Фоновий рівень | 97,7±0,6\* | 97,6±0,5 | 97,6±0,5 |
| 4 | 62,6±0,8\* | 81,9±1,1\*# α | 71,9±0,7\*# |

Примітки:

1. \* – р<0,05 щодо фонового рівня;
2. # – р<0,05 щодо групи контрольної патології;
3. α – р<0,05 щодо німодипіну;
4. n – кількість тварин в групі.

При цьому поступається останньому за здатністю покращувати мікроциркуляцію в корі. Цей феномен можна пояснити тим, що адемол, завдяки своїм β-адреноблокувальним властивостям, на відміну від референсу денонсує дію вазопресорів на рівні капілярів, ліквідуючи тим самим капіляроспазм.

Проведене дослідження показало, що обидві моделі ВЧК супроводжуються падінням рівнів АТ та центрального тиску в середньому в 1,53 та 1,50 разу при ВМК і у 1,91 та 1,86 разу за САК відповідно, р<0,05. Таким чином, можна анонсувати, що зниження кровопостачання мозку через вертебральні та внутрішні сонні артерії може бути наслідком падіння АТ та ЦВТ.

Негативна динаміка першого показника опосередковано говорить про низький сер-цевий викид, а зниження другого – напряму засвідчує недостатнє повернення крові в праві відділи серця, що, в подальшому, і дається в знаки падінням АТ [157–159].

Отже, редукція центральної гемодинаміки, також є причиною погіршення мозкового кровоплину. Подібний факт, зниження швидкості кровобігу по внутрішніх сонних артеріях на тлі падіння АТ і ЦВТ, детально описано на моделях ГПМК за ішемічним типом [10,116]. Слід підкреслити, що САК супроводжується більш важкими (р<0,05) гемодинамічними зрушеннями відносно фонових значень, що і з находить своє підтвердження у достовірно більшій летальності упродовж перших 4-х діб інсульту (розділ 3).

На користь формування гіпоксично-аноксичних змін в корі та підкіркових структурах головного мозку у гострий період ВЧК, вказує стрімке зниження ступеня насичення крові киснем (SaO2), що також є прямим наслідком погіршення перфузії та тотального церебровазоспазму. На 4-ту добу після моделювання крововиливу, у групі контрольної патології показник SaO2 виявився вірогідно меншим відносно фону в середньому на 24,7 % (ВМК) і на 35,9 % відповідно при САК, р<0,05 (табл. 4.2 та 4.3). Покращення церебральної перфузії відбувалось на тлі достеменного зростання показника SaO2 відносно рівнів аналогічного показника у групі щурів контрольної патології при ВМК в середньому на 22,6 і 13,9 %, а при САК на 30,8 та 14,9 % відповідно. Оцінюючи ступінь відновлення даного показника, за своєю ефективність адемол перевершував референс в середньому на 7,6 і 13,9 % співвідносно до ВМК, або САК, р<0,05 (табл. 4.2 та 4.3). Підґрунтям до відновлення кровобігу та оксигенації в судинах мікроциркуляторного русла мозку на тлі нарізної терапії ВЧКадемолом та німодипіном, є стабілізація показників, що віддзеркалюють стан центральної гемодинаміки. Окрема інфузія досліджуваних препаратів, амортизувала падіння АТ та ЦВТ, стабілізуючи їх рівень на середніх значеннях, більших за такі у групі контрольної патології в середньому при ВМК, або САК в 1,43 та 1,85 рази (адемол, показник АТ), і в 1,51 та 1,86 разу (адемол, показник ЦВТ), а також на тлі німодипіну, відповідно при ВМК та САК в 1,15 та 1,31 рази (АТ), і в 1,41 та 1,59 рази (ЦВТ), р<0,05. На відміну від німодипіну, на тлі інфузіїадемолу досліджувані показники не мали вірогідних відмінностей порівняно із вихідними рівнями. Разом із цим, стимулювальна дія німодипіну на церебральний кровоплин відбувалась на тлі достовірної гіпотензії. Такий ефект при інсульті є недоречним, та більш того – небе-зпечним, і при прогресуванні подальшого зниження АТ, наприклад при підвищенні дози або швидкості інфузії, може призвести до зворотних та діаметрально проти-лежних до покращання мозкового кровоплину наслідків. У даному, гемодинамічному аспекті, адемол є більш безпечним та ефективним за препарат порівняння.

За величиною стимулювальної дії на мікроциркуляцію в корі головного мозку басейну СМА, адемол вірогідно переважав німодипін при ВМК в середньому в 1,44, а при САК в 1,54 разу відповідно. Покращення церебральної перфузії відбувалось на тлі достеменного зростання показника SaO2 відносно рівнів аналогічного показника у групі щурів контрольної патології при ВМК в середньому на 22,6 і 13,9%, а при САК на 30,8 та 14,9% відповідно.

За своєю ефективністюадемол перевершував референс в середньому на 7,6 і 13,9% співвідносно до ВМК, або САК, р<0,05. На відміну від німодипіну, на тлі інфузіїадемолу показники центральної гемодинаміки (АТ та ЦВТ) не мали вірогідних відмінностей порівняно із вихідними рівнями. Стимулювальна дія німодипіну на церебральний кровоплин відбувалась на тлі достовірної гіпотензії. Підґрунтям до відновлення міккроциркуляції та оксигенації в судинах мікроциркуляторного русла мозку на тлі нарізної терапії ВЧКадемолом та німодипіном, є стабілізація показників, що віддзеркалюють стан центральної гемодинаміки.

Резюмуючи дані, що були нами отримані при оцінці впливу адемолу на церебральну перфузію в умовах інсульту, стає очевидним, що при САК необхідно обов’язково з’ясувати, яким чином він впливає на показник ВЧТ. Моніторинг ВЧТ у щурів із САК на тлі інфузії розчинів адемолу та референс-препаратів показав, що лікувальне введення похідного адамантану в організм щурів із САК важкого ступеня сприяє зменшенню ВЧТ відносно тварин групи контрольної патології в середньому в у 2,88 рази (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Вплив адемолу та референс-препаратів на показник внутрішньочерепного тиску

у щурів із субарноїдальним крововиливом у критичний період інсульту,

M±m (n=7)

|  |  |
| --- | --- |
| Групи тварин | ВЧТ (ум. од.), 48 год |
| Псевдооперовані тварини+ 0,9% NаСІ, 2 мл/кг (n=7) | 4,286±0,0421 |
| САК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг  (група контрольної патології) (n=7) | 16,429±0,571 º |
| САК **+** адемол, 2 мг⁄кг (n=7) | 5,714±0,286 º\*#&α |
| САК + німодипін, 30 мкг⁄кг (n=7) | 7,268±0,42119º\*#& |
| САК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг (n=7) | 10,286±0,421 º\*# |
| САК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг (n=7) | 10,571±0,369 º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

2.\* – р<0,05 відносно контрольної патології;

3. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);

4. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг);

5. α – р<0,05 відносно німодипіну (30 мкг⁄кг);

6.n – кількість тварин в групі.

Паралельно, терапія німодипіном, який за величиною своїх нейропротектоних якостей, із поміж інших препаратів порівняння, найбільшою мірою співвідноситься із адемолом, сприяє деескалації цього показника гірше ніж адамантан, поступаючись останньому в середньому у 1,27 рази, р<0,05. Разом із цим, на тлі німодипіну ВЧТ виявився вірогідно нижчим відносно значень у групі тварин контрольної патології в середньому у 2,26 рази (проти 2,88 у разі застосування адемолу).

За ступенем депримуючого впливу на формування ВЧТ в умовах САК при введенні решти препаратів, можна зробити висновок, що вони також сприяють деескалації досліджуваного показника відносно контрольної патології в середньому у 1,6 рази (амантадину та магнію сульфат) співставляючись між собою.

Адемол вірогідно в середньому у 1,85 рази перевершує дієвість як амантадину, так і магнію сульфату.

## Висновок до розділу 4

Курсова 4-х денна інфузія щурам із модельним ВЧК 1,0 % розчину адемолу та референс-препарату німодипіну дозами відповідно 2 мг/кг та 30 мкг/кг, запобігала падінню мозкової перфузії, стабілізуючи її рівень на коефіцієнтах мікроциркуляції в корі, більших за такі у групі контрольної патології в середньому в 3,99 та 2,76 рази (внутрішньомозковий крововилив) і у 7,30 та 4,74 разу відповідно при САК (р<0,05), що відбувалось на тлі збільшення показника об’ємної швидкості мозкового кровотоку в центральній мозковій артерії відносно групи контрольної патології в середньому на 68,4 % (адемол) та 94,1 % (німодипін), р<0,05. На відміну від німодипіну, на тлі інфузіїадемолу показники центральної гемодинаміки (АТ та ЦВТ), а також рівень насичення крові киснем не мали вірогідних відмінностей порівняно із вихідними рівнями, а за ступенем депримуючого впливу на значення ВЧТ в умовах САКадемол перевершував ефективність амантадину і магнію сульфату в середньому у 1,85 рази, р<0,05.

# РОЗДІЛ 5

**МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ ІНТРАКРАНІАЛЬНИМ КРОВОВИЛИВОМ НА ТЛІ ТЕРАПІЇ АДЕМОЛОМ ЗА ЙОГО ВПЛИВОМ НА ПРОЦЕСИ НЕЙРОЦИТОЛІЗУ, НЕЙРОАПОПТОЗУ, НЕЙРОПРОЛІФЕРАЦІЇ**

## 5.1 Вплив адемолу та референс-препаратів на динаміку нейроцитолізу у головному мозку щурів із внутрішньочерепним крововиливом за вмістом нейрон-специфічної енолази

Аналіз рівня NSE у щурів із САК показав, що через 48 год після моделювання інсульту, рівень NSE вірогідно підвищився відносно аналогічного показника у псевдооперованих тварин в середньому у 24,9 рази, що засвідчує процес масивної деструкції мембран нейронів (нейродеструкція), табл 5.1.

Останнє добре співвідноситься із тим, що за показником летальності цей період є критичним у розвитку САК, а смертність перейшла позначку у 50 %. Лікувальне курсове в/в введення тваринам із САК адемолу умовно-ефективною дозою 2 мг/кг, подібно німодипіну та амантадину сульфату, супроводжувалось менш інтенсивним зростанням рівня NSE: через 48 год вміст ферменту зменшилась відносно групи контрольної патології, відповідно у 2,78; 1,77; 1,86 та 1,36 рази, р<0,05. Порівнюючи їх ефективність, можна стверджувати, що за цим параметром (деескалація вмісту енолази) ефективність адемолу була достеменно більшою за таку німодипіну або амантадину сульфату в середньому у 1,57 та 1,49 рази. Найбільші переваги адемол мав порівняно із магнієм сульфатом. На тлі останнього, рівень енолази, порівняно із рештою препаратів виявилась найбільшою, знизившись відносно тварин контрольної патології в середньому у 1,37 рази при вірогідній перевазі адемолу у 2,04 рази.

Таким чином, можна зробити заключення, що позитивна динаміка активності NSE на тлі адемолу вказує на його спроможність формування нейродеструктивних змін та збереженню цитоархітектонічної будови мозку, що корелює із високою виживаністю щурів із САК та поліпшенням неврологічного статусу (див. розділ 3).

Таблиця 5.1

Вплив адемолута референс-препаратів нарівень нейрон-специфічної енолази

у сироватці крові зі стегнової вени щурів із субарахноїдальним крововиливом

у критичний період інсульту (48 год експерименту) M±m (n=7)

|  |  |
| --- | --- |
| Групи тварин | Рівень нейрон-специфічної енолази, нг/мл |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 0,196±0,011 |
| САК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг(група контрольної патології) | 4,889±0,139 º |
| САК **+** адемол, 2 мг⁄кг, | 1,757±0,078 º\*#&α |
| САК + німодипін,30 мкг⁄кг | 2,764±0,086 º\*# |
| САК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 2,623±0,053 º\*# |
| САК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг | 3,577±0,092 º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

2.\* – р<0,05 відносно контрольної патології;

3. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);

4. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг);

5. α – р<0,05 відносно німодипіну.

В умовах ВМК дослідження активності нейромаркера у щурів показав, що через 96 год (4-та доба) після моделювання патології, рівень активності NSE вірогідно підвищився відносно аналогічного показника у псевдооперованих тварин у 18,1 рази, при цьому, в кінці спостереження (21-ша доба), рівень активності енолази продовжував залишатись підвищеним в середньому в 7 разів (табл. 5.2).

Отримані нами результати стосовно характеру коливань рівня енолази у різні періоди ВЧК співпадають із літературними даними [149-151,160,161].

Так, на думку дослідників, значне підвищення NSE в гострий період ВМК відбувається переважно за рахунок деструкції нейронів внаслідок безпосереднього впливу ішемічного чинника на внутрішньоклітинний метаболізм.У більш пізній період ГПМК, коли активуються адаптивні та репаративні процеси, вміст енолази поступово зменшується, однак не знижується до нормальних цифр.

Таблиця 5.2

Вплив адемолута референс-препаратів надинаміку рівня

нейрон-специфічної енолази (нг/мл) у сироватці крові зі стегнової вени щурів

із інтрацеребральноюгеморагією, M±m

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Групи тварин | Термін, доба | |
| 4 | 21 |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ,  2 мл/кг (n=15) | 0,156±0,008 | 0,134±0,012\* |
| ВМК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг  (група контрольної патології) (n=15) | 2,824±0,046º | 0,939±0,026º4 |
| ВМК **+** адемол, 2 мг⁄кг (n=15) | 1,071±0,016º\*#& | 0,267±0,014º\*#&4 |
| ВМК + німодипін,30 мкг⁄кг (n=15) | 1,154±0,046º\*# | 0,296±0,016º\*#4 |
| ВМК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг(n=15) | 1,256±0,059º\*# | 0,308±0,007º\*#4 |
| ВМК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг (n=15) | 1,898±0,087º\* | 0,581±0,013º\*4 |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;
2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);
4. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг);
5. 4 – р<0,05 відносно 4-ої доби у відповідній групі.

Подібна негативна динаміка активності NSE в умовах ГПМК за геморагічним типом, свідчить не тільки про значну величину вогнища ІР, а й дозволяє з певною вірогідністю передбачити несприятливий прогноз для хворого (летальний кінець, значне погіршення когнітивно-мнестичних функцій, втрату адаптаційних можливостей до навколишнього середовища, тощо).

Рівень енолази у контрольних тварин є віддзеркаленням негативної динаміки показника летальності щурів та їх неврологічного статусу впродовж усього терміну спостереження (розділ 3).

Лікувальне курсове в/в введення тваринам із ГПМК адемолу умовно-ефективною дозою 2 мг/кг, подібно німодипіну та амантадину сульфату, супроводжувалось менш інтенсивним зростанням активності NSE: через 96 год рівень ферменту зменшилась відносно контрольної групи відповідно у 2,63; 2,45 та 2,25 рази, а через 21-ну добу – у 3,52; 3,17 та 3,05 рази, р<0,05. Така дія досліджуваних препаратів, може свідчити про наявність у них цитопротекторного ефекту. Причому, в умовах гострої церебральної ІР за здатністю зменшувати рівень маркера нейродеструкції як у гострий так і у відновлювальний період ВЧК, терапія адемолом (2 мг/кг в/в), вірогідно переважає ефективність амантадину та магнію сульфату в середньому відповідно у 1,17 та 1,77 рази (4-та доба) та у 1,15 та 2,18 рази (21-ша доба), співставляючись при цьому з ефектом німодипіну в обидва строки.

Стосовно дієвості магнію сульфату слід зауважити, що на тлі його лікувального введення цитопротекторна дія проявилась найменшою мірою, порівняно із рештою препаратів, хоча вірогідно зменшилась відносно контролю. Це цілком узгоджується із результатами, які ми отримали при моніторингу виживаності щурів з інтрацеребральноюгеморагією та їх неврологічного статусу впродовж усього періоду його застосування (див. розділ 3).

Таким чином, наведені факти свідчать про спроможність адемолу сприяти збереженню нейроцитоархітектоніки при модельній інтрацеребральнійгеморагії, що знайшло відповідне цитометричне підтвердження.

## 5.2 Інтенсивність нейроапоптозу при експериментальному внутрішньомозковому крововиливі на тлі терапії адемолом

При вивченні енолазної активності при ВМК та можливості впливу адемолу на деескалацію цього нейромаркеру, ми оцінили спроможність препарату впливати на нейроцитоліз. Послідовним є паралельне дослідження антиапоптотичної дії адемолу в аналогічний період інтрацеребральноїгеморагії. У даній експериментальній серії, присвяченій оцінці протиаопоптотичних ефектів адемолу, цей феномен вивчали за допомогою методу протоковоїцитометрії (табл. 5.3 та рис. 5.1–5.4).

У тварин групи контрольної патології інтенсивність фрагментації ДНК в ядрах нейронів лобних часток кори головного мозку вирогідно підвищилась в середньому у 1,83 рази (табл. 5.3, рис. 5.1 та рис. 5.2).

Таблиця 5.3

Вплив адемолута німодипіну нафрагментацію ДНК в ядрах нейронів лобних часток кори головного мозку щурів із ВМК через 96 год терапії,М±m

|  |  |
| --- | --- |
| Умови досліду | Фрагментація ДНК, % |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг(n=8) | 7,96±0,35 |
| ВМК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг(група контрольної патології)(n=8) | 14,58±0,61º |
| ВМК **+** адемол, 2 мг⁄кг, (n=8) | 10,02±0,40º\* |
| ВМК + німодипін,30 мкг⁄кг(n=8) | 11,32±0,44º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;
2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. α – р<0,05 відносно німодипіну.

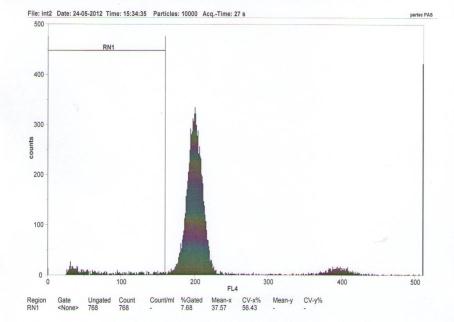
****

Рис. 5.1 Приклад ДНК-гістограми клітин кори головного мозку псевдооперованого щура через 96 год. Кількість подій 10000. SUB-G0G1 – фрагментація ДНК 7,68 %

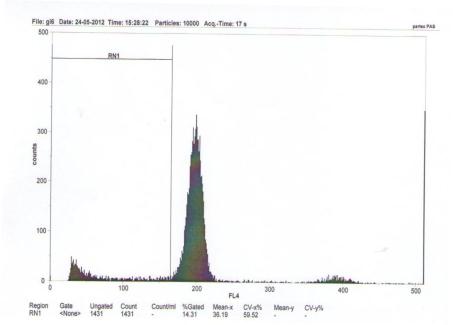


Рис. 5.2 Приклад ДНК-гістограми клітин кори головного мозку щура групи контрольної патології через 96 год. Кількість подій 10000. SUB-G0G1 – фрагментація ДНК 14,31 %

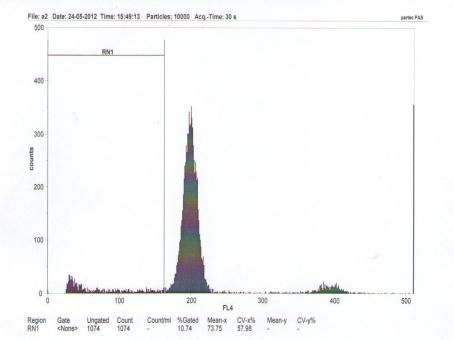


Рис. 5.3 Приклад ДНК-гістограми клітин кори головного мозку щура із ВМК через 96 год терапії адемолом (2 мл/кг). Кількість подій 10000. SUB-G0G1 – фрагментація ДНК 10,74 %

При цьому, адемол за антиапоптотичним ефектом перевершував референт в середньому на 13,0 %, р<0,05.

Очевидно, пригнічення апоптозу може свідчити про редукцію зони пенумбри за рахунок збільшення числа функціонально активних нейронів.

За даними наших попередніх досліджень лікувальне введення щурам з ВМК адемолу призводить до зниження величини деструктивних змін (нейронального некрозу) в перехідній зоні пенумбри. Пригнічення апоптозу, може свідчити про редукцію зони пенумбри за рахунок збільшення числа функціонально активних нейронів.

Отже, досліджуване похідне адамантану в умовах ВМК сприяє пригніченню процесів нейроцитолізу, та явищ нейроапоптозу, що може бути одним із механізмів церебропротекторної дії.

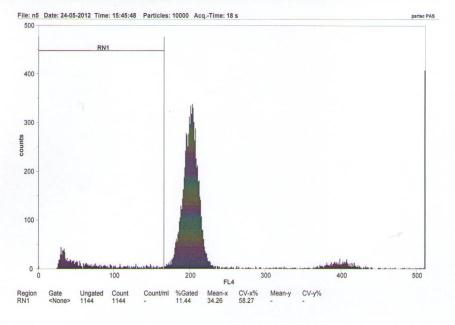
****

Рис. 5.4 Приклад ДНК-гістограми клітин кори головного мозку щура із ВМК через 96 год терапії німодипіном (30 мкг⁄кг). Кількість подій 10000. SUB-G0G1 – фрагментація ДНК 11,44%

## 5.3 Дія адемолу та референс-препаратів на активність нейропроліферативних процесів у головному мозку щурів із внутрішньомозковим крововиливом за рівнем білка S100 та даними протоково-цитометричного аналізу

Проведене дослідження показало, що ущурів групи контрольної патології із ВМК середнього ступеня важкості, поряд із високою енолазною активністю, в сироватці крові виявлені високі рівні S100, котрі достеменно перевершували такі рівні у псевдооперованих тварин в середньому у 42,2 рази, і маніфестує тим самим нейропроліферацію, чому передував масивний нейроцитоліз (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Вплив адемолута референс-препаратів нарівень білка S100 у сироватці крові

зі стегнової вени щурів із внутрішньомозковим крововиливом

у гострий період інсульту (96 год експерименту – 4-та доба),M±m

|  |  |
| --- | --- |
| Групи тварин | Рівень білка S100, нг/мл |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг(n=7) | 0,239±0,016 |
| ВМК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг(група контрольної патології)(n=7) | 10,091±0,185 º |
| ВМК **+** адемол, 2 мг⁄кг(n=7) | 3,516±0,081 º\*#&α |
| ВМК + німодипін,30 мкг⁄кг(n=7) | 4,757±0,20 º\*#& |
| ВМК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг(n=7) | 5,763±0,158 º\*# |
| ВМК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг(n=7) | 8,08±0,154 º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;
2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);
4. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг);
5. α – р<0,05 відносно німодипіну.

На противагу цьому, терапія всіма використаними нейропротекторами гальмувало підвищення рівнів S100. За своєю спрямованістю, при наявній векторній тотожності, вони мали між собою вірогідну відмінність по силі гальмування проліферації нейроглії. Найбільшу депримуючу дію на експресію верифікованого ензиму мав адемол. На тлі його інфузії сироватковий рівень S100 був меншим відносно контрольної патології в середньому у 2,87 рази, р<0,05, вірогідно переважаючи ефективність німодипіну в 1,35, амантадину сульфату – в 1,64, а магнію сульфату відповідно у 2,3 рази (табл. 5.4). Таким чином, на основі отриманих даних стосовно змін рівнів S100 у сироватці крові зі стегнової вени щурів із ВМК у гострий період інсульту (96 год експерименту – 4-та доба) можна побудувати наступний варіаційний ряд: псевдооперовані щури >адемол>німодипін>амантадину сульфат > магнію сульфат.

В такому ряді той препарат проявляє найбільший захисний вплив на головний мозок, через послаблення нейропроліферативних процесів, який знаходиться ближче до групи псевдооперованих тварин. Отже, адемолу, порівняно із рештою досліджуваних нейропротекторів притаманна найбільша нейроцитопротекторна активність, що доводиться не тільки зменшенням активності енолази, а й протидією до підвищення рівнів S100 проти групи контрольної патології.

Протоково-цитометричний аналіз дає змогу додатково кількісно оцінити параметри формування ішемічного вогнища, котре з настанням відновного періоду представлене вже не деструктивно-зміненими нейронами, а нейрогліоцитами. При проведенні протоково-цитометричного аналізу, про підвищену активність останніх, свідчить поява ядер у фазі синтезу (фаза S клітинного циклу). У тварин групи контрольної патології кількість клітин в суспензії, отриманої із лобних часток кори головного мозку, ядерна ДНК котрих перебуває у стадії поділу вірогідно підвищилась в середньому у 12,3 рази (табл. 5.5) від аналогічних значень в групі псевдооперованих тварин.

У останніх, оперативне втручання, як встановлено, не призвело ні до підвищення енолазної активності чи зростання вмісту S100, ні до маніфестації нейроапоптозу.

Одержані дані можуть вказувати на те, що процес формування вогнища ішемічної напівтіні (пенумбри) – заміни деструктивно-змінених нейронів у стадії нейроцитолізу на нейрогліальні елементи, вже наприкінці гострого періоду (4-та доба ВМК) відбувається активно.

Таблиця 5.5

Вплив адемолу та німодипіну на активацію фази синтезу ДНК

в ядрах клітин суспензії з лобних часток кори головного мозку щурів із ВМК через 96 год терапії,М±m

|  |  |
| --- | --- |
| Умови досліду | Синтез ДНК (фаза S, %) |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг(n=8) | 0,131±0,009 |
| ВМК+ 0,9% NаСІ, 2 мл/кг(група контрольної патології)(n=8) | 1,610±0,048º |
| ВМК**+** адемол, 2 мг⁄кг(n=8) | 0,538±0,025º\*α |
| ВМК+ німодипін,30 мкг⁄кг(n=8) | 0,906±0,027º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;
2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. α – р<0,05 відносно німодипіну.

Окреме курсове лікувальне введення щурам із ГПМК адемолу, так само, як і німодипіну чинило подібний за вектором, однак, різний за силою депримуючий вплив на організацію ішемічного вогнища, у першу чергу, за рахунок зменшення необоротно пошкоджених нейроцитів.

Так, на тлі адемолу, відсотковий вміст у досліджуваній клітинній суспензії ядер із ДНК у фазі S, виявився меншим відносно тотожного показника у групі контрольної патології, або у тварин, яким проводили терапію німодипіном в середньому відповідно у 3,0 та 1,68 рази, р<0,05. Така перевага адемолу над референсом є закономірною, оскільки, очевидна перевага першого була продемонстрована при оцінці енолазної активності, а NSE, як вже неодноразово підкреслювалось, відображає нейроцитоліз, у відповідь на котрий і відбувається поділ нейроглії.

Очевидно, низька активність нейроглії на тлі терапії ВМК розчином адемолу, вказує на той факт, що він володіє церебропротекторною активністю, внаслідок чого значно зменшується нейронекроз і зберігається морфо-структурна цілісність мозку. Причому, за своєю захисною дією, по даним протоково-цитометричного аналізу у розрізі виділення клітин у фазі S адемол вірогідно переважає німодипін. Отже, досліджуване похідне адамантану в умовах ВМК сприяє пригніченню процесів нейроцитолізу та асоційованої з останнім нейропроліферації, і є одним із клітинних механізмів його церебропротекторної дії.

## 5.4 Оцінка впливу адемолу на морфо-деструктивні зміни у головному мозку щурів з інтракраніальним крововиливом за даними світлової мікроскопії

Одним із наглядних доказів морфо-деструктивних явищ, що мають в головному мозку при моделюванні ВЧК може стати оцінка мікропрепаратів за допомогою світлової мікроскопії. Отримані дані є оціночними, з певною часткою суб’єктивізму, оскільки ґрунтуються на описі того зображення, на якому фіксує свою увагу гістолог. Проте, оглядова світлова мікроскопія, незважаючи на більш сучасні методики морфологічної оцінки, залишається актуальною. Доказом цього є широке використання цього методу експрес-діагностики (оперативні втручання), а також при проведенні патолого-анатомічного дослідження. Беззаперечною перевагою цього методу, є відносна простота та доступність, оскільки для своєї реалізації цей різновид мікроскопічного аналізу не потребує дороговартісного морфологічного обладнання, що насьогодні набуває особливого значення. При доклінічних дослідженнях, проведення аналізу морфологічних змін за допомогою світлового мікроскопу дозволяє наглядно охарактеризувати модель патологічного стану та оцінити ефективність терапії. При візуальній оцінці фотографій зроблених із мікропрепаратів САП, гіпокампальної зони та кори сомато-сенсорної кори псевдооперованих щурів (4-та доба), можна зробити заключення, яке деталізовано нижче (рис. 5.1, 5.2).

САП вільний від крові, в ньому інтерпретуються судини мякої мозкової оболонки, в артеріолах якої можна диференціювати окремі шари (м’язів, ендотеліальнавистілка, тощо), помітні венули, заповнені кровю.

В судинах можна помітити форменні елементи крові (еритроцити), периваскулярний набряк відсутній, як і відсутній діапедез еритроцитів у навколишньосудинний простір. Немає ознак просякнення та імбібіції кров’ю мозкової тканини. Між судинами мікроциркуляторного русла виявляються нейрони, в яких чітко диференціюються основні структурні елементи, такі як тіло нейрону, відростки (аксони і дендрити), ядро та ядерце. Немає ознак перицелюлярного набряку та ознак нейродегенеративних явищ (рис. 5.1 (А) та 5.2 (А)).

На 4-ту добу після введення аутокрові під м'яку мозкову оболонку, так само як і безпосередньо в саму речовину мозку, супроводжувалось характерними для цього стану деструктивно-дегенеративними змінами, опис яких деталізовано далі по тексту.

На рис. 5.5 фрагмент Б та В представлено типові морфологічні зміни, які мають місце в САП (під м'якою мозковою оболонкою), у вигляді крововиливу при САК та гематоми при ВМК, помітно окремі форменні елементи крові, виявляється імбібована еритроцитами мозкова тканина.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| А. | |
|  |  |
| Б. | |
|  | -- |
| В. | |

Рис. 5.5. Фрагмент мікропрепарату мозку щурів (власні дані). Забарвлення гематоксилін-еозин. Окуляр х40. Об’єктив х10. Незмінений субарахноїдальний простір (А); крововилив у мозок (Б); субарахноїдальний крововилив (В), де: 1 – речовина мозку; 2 – субарахноїдальний простір; 3 – артеріола; 4 – венула; 5– форменні елементи; 6 – нейрони (а -тіло; б – відростки аксони та дендрити; в – ядра); 7 – рідка кров

Судини мікроциркуляторного русла, перш за все артеріоли, спазмовані внаслідок рефлекторної вазоконстрикції, що є характерним для гострого періоду церебрального крововиливу (особливо САК), наявний добре виражений перивазальний набряк.

При оцінці нейрональнихпатоморфологічних змін на 4-ту добу інсульту (рис. 5.6 Б та В), помітна генералізована (при ВМК) деструкція, яка за умов САК набуває експансивний характер.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| А. | |
|  |  |
| Б. | |
|  |  |
| В. | |

Рис. 5.6. Фрагмент мікропрепарату мозку щурів (власні дані). Забарвлення гематоксилін-еозин. (А) Окуляр х40. Об’єктив х10; (Б та В) Окуляр х10. Об’єктив х10, де: 1 – речовина мозку; 2 – субарахноїдальний простір; 3 – артеріола; 4 – венула; 5– форменні елементи; 6 – нейрони (а -тіло; б – відростки аксони та дендрити; в – ядра); 7 – рідка кров

Тіла нейронів, котрі задіяні у цих процесах візуалізуються нечітко, втрачають ядра, відростки, а ядерця знаходяться в цитозолі. Помітні ознаки набряку-набухання. Так набряк обмежений навколоклітинним простором і на мікропрепараті виглядає як просвітлення, а явище набухання відбувається в самій клітині, за рахунок чого вона приймає округлу форму.

Терапія ВЧК, як адемолом так і препаратом порівняння німодипіном, амортизувало деструктивно-дегенеративні явища рис. 5.7 та 5.8).

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| А. | |
|  |  |
| Б. | |

Рис. 5.7. Фрагмент мікропрепарату мозку щурів (власні дані). Забарвлення гематоксилін-еозин. Окуляр х40. Об’єктив х10, де: 1 – речовина мозку; 2 – субарахноїдальний простір; 3 – артеріола; 4 – венула; 5– форменні елементи; 6 – нейрони (а -тіло; б – відростки аксони та дендрити; в – ядра); 7 – рідка кров

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| А. | |
|  |  |
| Б. | |

Рис. 5.8. Фрагмент мікропрепарату мозку щурів (власні дані). Забарвлення гематоксилін-еозин. Окуляр х40. Об’єктив х10, де: 1 – речовина мозку; 2 – субарахноїдальний простір; 3 – артеріола; 4 – венула; 5– форменні елементи; 6 – нейрони (а -тіло; б – відростки аксони та дендрити; в – ядра); 7 – рідка кров

Це проявилось і характеризувалось наступним. Ознаки перивазального набряку, вазоспазму, артеріоло- та веностазу були майже відсутніми. Кортикальні нейрони, а також нейрони гіпокампу мали типову диференціацію, характерну для функціонально спроможних клітин.

Чітко візуалізувались ядра, а вних по центру ядерця, незмінена цитоплазма, мембрана мала ознаки характерні для її цілісної будови, перинейрональний набряк відсутній, весь цитозоль знаходився в межах контуру тіл нейронів від яких відходили аксони та дендрити.

В цілому, гістоморфологічна картина на тлі терапії обома препаратами мала вигляд, котрий наближався до панорами у псевдооперованих щурів, які було отримано при імуноферментному досліджені специфічних нейромаркерів.

## Висновок до розділу 5

В критичний період САКадемол за величиною послаблення нейроцитолізу, який верифікували за вмістом нейромаркера нейрон-специфічної енолази вірогідно переважав дієвість німодипіну, амантадину та магнію сульфату в середньому у 1,57, 1,49 та 2,04 рази, виявляючи при цьому антинейроапоптотичний та антинейрогліопроліферативний ефекти (оцінені при ВМК відповідно за ступенем фрагментації ядерної ДНК та рівнем S100 і активацією фази синтезу ДНК), переважаючи німодипін в середньому на 13,0 % (апоптоз), та у 1,35 та 1,68 рази (нейропроліферація за вмістом S100 і протоково-цитометричним критерієм), р<0,05.

За даними світлової мікроскопії, гістоморфологічна картина на тлі терапії адемолом і німодипіном мала вигляд, котрий наближався до панорами у псевдооперованих щурів, що доповнює факти, які було отримано при імуноферментному та цитометричному досліджені.

# РОЗДІЛ 6

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВНУТРІШНЬОНЕЙРОНАЛЬНИХ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ НА ТЛІ ТЕРАПІЇ АДЕМОЛОМ**

## 6.1. Зміни пулу макроергів та інтермедіатів вуглеводного обміну в головному мозку щурів із субарахноїдальним крововиливом при терапії адемолом

У цьому розділі на моделі САК досліджено деякі біохімічні аспекти церебропротекторної дії промислового зразка 1,0 % розчину адемолу, а саме його вплив на показники вуглеводного (вміст лактату та пірувату), енергетичного обмінів (вміст аденілових нуклеотидів, енергетичний заряд), стан антиоксидантних систем (активність ензимів: СОД, ГПО, каталази), активність процесів ліпопероксидації (вміст МДА), окисної деструкції білків (вміст КГП), а також стан системи L-аргінін / NO в мозку щурів, як можливі метаболітотропні складові його захисного ефекту на нейрони головного мозку при САК. Дослідження метаболізму аденілових нуклеотидів за умов ВЧК (табл. 6.1) показало, що станом на 4-ту добу експерименту у головному мозку щурів групи контрольної патології порівняно з псевдооперованими тваринами вірогідно знижувались запаси АТФ в середньому на 63,8 %, і зростав вміст АДФ та АМФ (їх рівень підвищився відповідно у 2,27 та 1,7 рази). За цих умов реєструвалось статистично достовірне падіння енергетичного заряду клітин головного мозку в середньому на 34,6 %, що свідчить про зниження енергетичного потенціалу та розвиток гіпоенергетичного стану. Ймовірно, описані зміни є наслідком пригнічення процесу окисного фосфорилування та зниження ступеня його супряження з тканинним диханням.

На 21-шу добу експерименту (відновний період САК), відмічалось зменшення пертурбацій в метаболізмі аденілових нуклеотидів (табл. 6.1).

Так, зниження вмісту АТФ та енергетичного заряду становило відповідно 43,1 та 23,9 %, а рівні АДФ та АМФ підвищились відповідно у 2,1 та 1,6 рази, при чому рівень цих показників все ще достовірно відрізнявся від таких у псевдооперованих щурів.

Таблиця 6.1

Динаміка впливу адемолу на вміст аденілових нуклеотидів у мозку щурів

на тлі субарахноїдального крововиливу,М±m(n=15)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Групи тварин | Термінексперименту (доба) | Показники | | | | |
| АТФ, мкмоль / г сухої тканини | АДФ, мкмоль / г сухої тканини | АМФ,мкмоль / г сухої тканини | Енергетичний заряд |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 2,82±0,12 | 0,853±0,02 | 0,600±0,031 | 0,759±0,006 |
| 21 | 2,90±0,14 | 0,850±0,029 | 0,578±0,048 | 0,769±0,007 |
| САК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 1,02±0,10º | 1,95±0,05º | 1,02±0,05º | 0,496±0,009º |
| 21 | 1,65±0,09º | 1,78±0,09º | 0,912±0,060º | 0,585±0,006º |
| САК **+** адемол, 2 мг⁄кг | 4 | 1,48±0,07º\*&# | 1,21±0,09º\*&# | 0,762±0,041º\*&# | 0,605±0,005º\*&# |
| 21 | 2,72±0,14\*&# | 0,936±0,075\*&# | 0,602±0,039\*&# | 0,751±0,008\*&# |
| САК + німодипін,30 мкг⁄кг | 4 | 1,44±0,08º\* | 1,26 ±0,08º\* | 0,746±0,034º\* | 0,600±0,008º\* |
| 21 | 2,78±0,13\* | 0,910±0,072\* | 0,591±0,048\* | 0,759±0,007\* |
| САК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 4 | 1,24±0,05º\* | 1,48±0,06º\* | 0,878±0,033º\* | 0,553±0,005º\* |
| 21 | 2,31±0,10º\* | 1,18±0,08º\* | 0,701±0,020º\* | 0,692±0,004º\* |
| САК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг | 4 | 1,12±0,09º | 1,72±0,10º | 0,940±0,043º | 0,520±0,008º\* |
| 21 | 1,95±0,08º\* | 1,50±0,06º\* | 0,770±0,019º\* | 0,639±0,004º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;
2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. # – р<0,05 у відповідні строки між адемолом та магнію сульфатом;
4. &– р<0,05 у відповідні строки між адемолом та амантадином.

Терапія експериментального ВМК досліджуваними препаратами достовірно зменшувало масштабність порушень обміну аденілових нуклеотидів, індукованих ВЧК, що супроводжувалось збільшенням енергетичного потенціалу головного мозку, особливо на 21-шу добу після початку лікування.

Так, після застосування найбільш ефективних із них: німодипіну, адемолу та амантадину сульфату упродовж 4-х діб, відмічалось збільшення вмісту АТФ (в середньому на 41,2, 45,1 та 21,6 % відповідно), енергетичного заряду (в середньому на 20,9, 21,9 та 10,9 % відповідно), зменшення рівня АДФ (в середньому на 35,5, 38,0 та 24,2 % відповідно) і АМФ (в середньому на 26,9, 25,3 та 13,9 % відповідно), порівняно із тваринами групи контрольної патології. У цей же час, аналогічна за дизайном терапія САК розчином магнію сульфатом, не викликало достовірних змін.

Ще більшою мірою (при р<0,05), сприяло відновленню балансу в обміні аденілових нуклеотидів у тканинах головного мозку застосування досліджуваних речовин упродовж 21-ї доби САК. Найбільша дія реєструвалась у адемолу та німодипіну, менша – у амантадину сульфату, а найменша – у магнію сульфату.

За умов геморагічного ураження мозку у ньому виявлено зміни у співвідношенні процесів аеробного та анаеробного розщеплення глюкози (табл. 6.2): зареєстровано статистично вірогідне падіння вмісту пірувату (в середньому на 60,3 та 51,0 %, відповідно на 4-ту і 21-шу добу експерименту), збільшення вмісту лактату (в середньому у 4,33 та 3,76 рази відповідно на 4-ту і 21-шу добу експерименту) та співвідношення лактат / піруват (в середньому у 11,3 та 7,8 рази відповідно на 4-ту і 21-шу добу експерименту). Тобто, за умов ВЧК зменшується активність аеробного гліколізу та активується анаеробний шлях метаболізму глюкози, що супроводжується розвитком лактатацидозу в клітинах головного мозку (табл. 6.2).

Курсове застосування досліджуваних нейропротекторів при ВМК, крім магнію сульфату, упродовж гострого періоду інсульту (4-х діб) викликало збільшення активності аеробного шляху окиснення глюкози в мозку щурів, про щосвідчило збільшення вмісту пірувату, зниження рівня лактату та співвідношення лактат / піруват, порівняно із відповідними показниками у тварин групи контрольної патології.За цих умов адемол, і, меншою мірою німодипін, мали найбільш потужний вплив на метаболізм глюкози.

Таблиця 6.2

Динаміка впливу адемолу на вміст метаболітів глюкози у мозку щурів на тлі субарахноїдального крововиливу,М±m(n=15)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Групи тварин | Термін  експерименту,, (доба) | Показники | | |
| Лактат,  мкмоль / г сухої тканини | Піруват,  мкмоль / г сухої тканини | Лактат / Піруват |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 1,66±0,02 | 0,300±0,017 | 5,76±0,29 |
| 21 | 1,60±0,03 | 0,294±0,019 | 5,73±0,33 |
| САК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 7,19±0,11º | 0,119±0,008º | 65,4±5,70º |
| 21 | 6,02±0,14º | 0,144±0,011º | 44,9±3,40º |
| САК **+** адемол,  2 мг⁄кг | 4 | 4,90±0,16º\* | 0,170±0,013\* | 30,4±1,78º\* |
| 21 | 3,13±0,21º\* | 0,275±0,013\* | 11,3±0,51º\* |
| САК + німодипін,  30 мкг⁄кг | 4 | 4,42±0,13º\*&#α | 0,183±0,014\*&# | 26,2±2,08º\*&#α |
| 21 | 2,56±0,15º\*&#α | 0,285±0,012\*&# | 8,96±0,30º\*&#α |
| САК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 4 | 5,40±0,15º\* | 0,132±0,012º\* | 45,5±4,14º\* |
| 21 | 3,73±0,19º\* | 0,234±0,014 º\* | 16,3±0,74º\* |
| САК + магнію сульфат,  250 мг⁄кг | 4 | 6,74±0,19º | 0,116±0,007º | 61,0±3,72º |
| 21 | 5,13±0,23º\* | 0,170±0,013º | 31,8±1,79º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;
2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. # – р<0,05 у відповідні строки між адемолом та магнію сульфатом;
4. &– р<0,05 у відповідні строки між адемолом та амантадином;
5. α – р<0,05 у відповідні строки між адемолом та німодипіном.

Натомість, 21-но денна фармакотерапія САК, проти попереднього строку (4-та доба), закономірно до динаміки макроергів виявляла достеменно ліпшу коригувальну дію на порушений метаболізм глюкози. Так, введення німодипіну, адемолу, амантадину сульфату та магнію сульфату викликало вірогідне збільшення вмісту пірувату відповідно на 91,0, 97,9, 62,4 та 18,1 %, зниження рівня лактату – на 48,0; 57,4; 38,0 та 14,8 %, а також зменшення співвідношення лактат / піруват – 74,7; 80,0; 63,7 та 29,3 %, порівняно із значеннями у тварин групи контрольної патології.

Таким чином ВЧК супроводжувався вираженими пертурбаціями обмінних процесів у головному мозку щурів. За цих умов в тканинах мозку реєструвалось пригнічення аеробного окиснення глюкози, посилення анаеробного гліколізу та розвиток лактатацидозу (доказом чого було зменшення вмісту пірувату та зростання рівня лактату й співвідношення лактат / піруват). Поряд з цим в тканинах головного мозку розвивався гіпоенергетичний стан (зменшувався енергетичний заряд клітин), знижувались запаси макроергічнихсполук (АТФ), пригнічувався процес окисного фосфорилування (зростав вміст АДФ, АМФ та виникав дефіцит АТФ) та зменшувалась ступінь його супряження з тканинним диханням.

## 6.2 Вплив адемолу на перебіг оксидативного стресу та обмін монооксиду азоту в головному мозку щурів із субарахноїдальним крововиливом

Оцінка оксидативного статусу нейронів головного мозку в умовах ВМК на тлі терапії адемолом за традиційними маркерними величинами цього процесу, є вкрай важливим для кращого розуміння внутрішньоклітинних метаболітотропних механізмів його церебпротекторної активності. Справедливість такої тези стає очевидною, якщо зважити на той факт, що продукти ліпопероксидації та окисної модифікації білків, рівною мірою є тригерними факторами для індукції як апоптозу, так і некробіозу. Отож, антиоксидантна дія адемолу може лежати в основі його захисного впливу на головний мозок. З’ясуванню цього фармакодинамічного аспекту препарату було присвячено наступне дослідження (табл. 6.3).

ВЧК у щурів супроводжувався активацією в мозку процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів. Станом на 4-ту та 21-шу добу після модулювання ВЧК відмічалось статистично вірогідне зростання вмісту МДА відповідно в 2,5 та 2,2 рази, а також КГП в середньому на 71,0 та 57,7 %, порівняно з аналогічними показниками у групі псевдооперованих тварин.

Таблиця 6.3

Динаміка впливу адемолу на вміст продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів

у мозку щурів за умов внутрішньочерепного крововиливу

в різні терміни експерименту, М±m(n=15)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Групи тварин | Термін  експерименту (доба) | Показники | |
| МДА, мкмоль / г  сухої тканини | КГП, нмоль / мг протеїну |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 12,4±0,54 | 4,41±0,14 |
| 21 | 12,0±0,64 | 4,30±0,13 |
| САК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 30,5±0,60º | 7,54±0,18º |
| 21 | 26,6±0,50º | 6,78±0,17º |
| САК **+** адемол, 2 мг⁄кг | 4 | 21,2±0,34º\* | 6,12±0,19º\* |
| 21 | 15,0±0,45º\* | 4,75±0,14º\* |
| САК + німодипін,  30 мкг⁄кг | 4 | 19,5±0,39º\*&#α | 5,55±0,16º\*&#α |
| 21 | 13,4±0,46\*&#α | 4,38±0,09\*&#α |
| САК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 4 | 24,5±0,44º\* | 6,49±0,23º\* |
| 21 | 16,6±0,53º\* | 5,24±0,16\* |
| САК К + магнію сульфат, 250 мг⁄кг | 4 | 28,5±0,58º\* | 7,01±0,24º |
| 21 | 19,5±0,60º\* | 5,96±0,21º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

3.\* – р<0,05 відносно контрольної патології;

4. # – р<0,05 у відповідні строки між адемолом та магнезією;

5. &– р<0,05 у відповідні строки між адемолом та амантадином;

6. α– р<0,05 у відповідні строки між адемолом та німодипіном.

Застосування досліджуваних препаратів упродовж 4-х діб достовірно відносно групи контрольної патології, зменшувало вміст досліджуваних маркерів оксидативного стресу (окрім магнію сульфату), причому максимальний ефект відмічався на тлі введення адемолу.

В той же час, за умов тривалого (21-на доба САК) введення німодипіну, адемолу, амантадину та магнію сульфату відмічалось більш виразне пригнічення процесів пероксидації ліпідів та білків: зниження вмісту МДА становило відповідно 43,8, 49,6, 37,6 та 26,7 %, а рівня КГП – 30,0, 35,4, 22,8 та 12,1 %, порівняно з контрольною патологією. Тобто, найбільший депримуючий вплив на активність процесів ліпоперо-ксидації та окисної модифікації протеїнів мав адемол, достовірно менший – німоди-пін, їм поступався амантадину сульфат, а найменший реєструвався у магнія сульфату.

Однією із причин активації вільнорадикального окиснення ліпідів та білків є дисбаланс в про- та антиоксидантних системах (табл. 6.4).

Тому, ми оцінили вплив геморагічного ураження головного мозку на активність антиоксидантних ензимів – СОД, ГПО та каталази в тканинах головного мозку, а також їх зміни на тлі терапії. За умов ВЧК у тварин групи контрольної патології відмічалось достовірне падіння активності СОД (в середньому на 59,6 і 43,0 % відповідно на 4-ту та 21-шу добу експерименту), порівняно з псевдооперованими тваринами, що супроводжувалось накопиченням цитотоксичного супероксидного аніон-радикалу.

Поряд із цим зареєстровано зменшення здатності тканин головного мозку знешкоджувати гідроген пероксид в ензиматичних реакціях, каталізованих ГПО (її активність знизилась в середньому на 57,4 і 41,2 % відповідно на 4-ту та 21-шу добу експерименту) та каталазою (активність цього ензиму у гострий період САК виявилась нижчою за аналогічні значення у тварин групи контрольної патології в середньому на 60,6 і 44,2 % відповідно.Терапія досліджуваними препаратами зменшувало депримуючий вплив геморагічного ураження головного мозку на активність антиоксидантних ензимів (табл. 6.4).

Зокрема, на 4-ту добу після їх окремого введення тваринам із ВМК, достовірне зменшення активності СОД та ГПО реєструвалось лише в групі тварин, які отримували німодипін та адемол, тоді як вірогідне зниження активності каталази виявлялось у всіх групах лікованих тварин, за винятком тих, які отримували розчин магнію сульфату.

Таблиця 6.4

Активність антиоксидантних ензимів в мозку щурів в динаміці внутрішньочерепного крововиливу на лі терапії адемолом та препаратами порівняння,М±m(n=15)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Групи тварин | Термін  експерименту (доба) | Показники | | |
| ГПО,  мкмоль / хв на 1 мг протеїну | СОД,  ум.од / мг протеїну | Каталаза,  мккатал / мг протеїну |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 67,2±2,37 | 2,35±0,12 | 6,15±0,17 |
| 21 | 68,4±2,68 | 2,42±0,11 | 6,27±0,19 |
| САК + 0,9% NаСІ,  2 мл/кг | 4 | 28,6±2,04º | 0,95±0,08º | 2,42±0,15º |
| 21 | 40,2±2,25º | 1,38±0,13º | 3,50±0,18º |
| САК **+** адемол,  2 мг⁄кг | 4 | 35,8±2,05º\* | 1,35±0,11º\* | 3,33±0,16º\* |
| 21 | 56,5±2,10\* | 2,28±0,10\* | 5,91±0,29\* |
| САК + німодипін,  30 мкг⁄кг | 4 | 37,5±2,03º\*&# | 1,40±0,13º\*&# | 3,46±0,14º\*&# |
| 21 | 61,4±2,29\*&# | 2,34±0,14\*&# | 6,15±0,25\*&# |
| САК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 4 | 32,4±1,80º | 1,20±0,14º | 2,95±0,17º\* |
| 21 | 50,0±1,82º\* | 1,99±0,09º\* | 5,12±0,22º\* |
| САК + магнію сульфат,  250мг⁄кг | 4 | 29,8±1,82º | 1,03±0,10º | 2,64±0,12º |
| 21 | 43,1±1,12º | 1,54±0,11º | 4,28±0,24º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;
2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. # – р<0,05 у відповідні строки між адемолом та магнієм сульфатом;
4. &– р<0,05 у відповідні строки між адемолом та амантадином.

Більшою мірою антиоксидантний потенціал клітин головного мозку зростав на тлі застосування препаратів упродовж 21-ї доби САК.Так, введення німодипіну, адемолу та амантадину сульфату супроводжувалось збільшенням порівняно із тотожними показниками у щурів групи контрольно патології активності ГПО в середньому відповідно на 40,5, 52,7 і 17,9 %, СОД – на 65,2, 69,6 та 37,1 %, а також каталази відповідно на 68,9, 75,7 та 42,6 %,.

При цьому, тривале 21-но денне введення магнію сульфату достовірно не впливало на активність ГПО та СОД, і вірогідно (в середньому на 22,4 %) зменшувало активність каталази. Отже, адемол та німодипін найбільшою мірою зменшували негативний вплив ішемічно-гіпоксичного чинника в умовах ВЧК на стан ензимних систем інактивації активних форм кисню. У амантадину сульфату вказаний ефект порівняно з попередніми препаратами проявився достовірно меншою мірою, проте у магнезії така дія була майже відсутньою взагалі.

Встановлено, що за умов модельного ВЧК в структурах головного мозку щурів формувався дисбаланс у системі L-аргінін / NO (табл. 6.5).

Зокрема, станом на 4-ту добу експерименту вміст в нейронах амінокислоти аргініну знизився відносно псевдооперованих тварин в середньому на 68,9 %, а сумарна активність NO-синтази зростала відповідно на 57,6 %. У той же час, станом на 21-шу добу експерименту зменшення пулу L-аргініну становило в середньому 50,2 %, а підвищення активності NO-синтази було в межах 46,1 %, що виявилось достовірно меншим проти гострого періоду. Можна зробити висновок, що виснаження запасів аргініну відбувається за рахунок активації NO-синтази, для якої ця амінокислота є субстратом. У свою чергу, певною мірою, наростання активності NO-синтази, можна пояснити активуючим впливом факторів запалення на експресію відповідних генів, що особливо має місце у відновний період.

Пропонована терапія ВЧК зменшувала дисбаланс в NO-продукуючій системі, за виключенням єдиного препарату – магнію сульфату, який достовірно не впливав на рівень L-аргініну та активність NO-синтази (табл. 6.5). При використанні препаратів упродовж перших 4-х діб ВМК інтрацребральний вміст L-аргініну вірогідно зростав, тоді як активність NO-синтази зменшувалась.

Причому достеменна деескалація відбувалась лише на тлі застосування адемолу та німодипіну. Натомість, тривале застосування досліджуваних препаратів упродовж 21-ї доби інсульту, чинило статистичний депримуючий вплив на сумарну активність NO-синтази та викликало достовірне підвищення запасів L-аргініну.

Таблиця 6.5

Вплив терапії адемолом та препаратами порівняння на стан системи L-аргінін / NO в мозку щурів за умов внутрішньочерепного крововиливу, М±m(n=15)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Групи тварин | Термін  експерименту (доба) | Показники | |
| L-аргінін,  нмоль / мг протеїну | NO-синтаза,  пмоль / хв на 1 мг протеїну |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 61,5±1,25 | 118±2,88 |
| 21 | 60,4±1,32 | 115±3,09 |
| САК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 4 | 19,1±1,10º | 186±4,01º |
| 21 | 30,1±1,11º | 168±4,07º |
| САК **+** адемол, 2 мг⁄кг | 4 | 27,5±1,08º\* | 160±3,01º\* |
| 21 | 50,4±1,25º\* | 133±3,24º\* |
| САК + німодипін,30 мкг⁄кг | 4 | 31,1±1,14º\*&#α | 148±2,98º\*&# |
| 21 | 56,2±1,19º\*&#α | 122±3,17\*&#α |
| САК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 4 | 23,6±1,03º\* | 171±3,28º\* |
| 21 | 44,6±1,20º\* | 146±3,85º\* |
| САК + магнію сульфат,  250 мг⁄кг | 4 | 20,5±1,18º | 178±3,41º |
| 21 | 32,5±1,30º | 160±3,44º |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;
2. \* – р<0,05 відносно контрольної патології;
3. # – р<0,05 у відповідні строки між адемолом та магнезією
4. &– р<0,05 у відповідні строки між адемолом та амантадином сульфатом;
5. α – р<0,05 у відповідні строки між адемолом та німодипіном.

Так, максимальну здатність зменшувати дисбаланс в системі L-аргінін / NO було зафіксовано у адемолу (викликав збільшення вмісту аргініну та зменшення активності NO-синтази порівняноі з контрольною патологією в середньому відповідно на 86,7 та 27,4 %,). Відносно тварин групи контрольної патології німодипін показав достовірно менший ефект, оскільки на тлі його введення в організм тварин із САК зміна рівнів та активності вказаних показників була в межах 67,4 та 20,8 %.

Останньому поступався амантадину сульфат, який викликав збільшення вмісту аргініну в середньому на 41,0%, а зниження активності NO-синтази відповідно на 11,0 %. За цих умов найменшу здатність коригувати зміни в системі синтезу нітроген монооксиду (NО) виявляв розчин магнію сульфату.

## 6.3 Вплив адемолу та референс-препаратів на формування глутаматної та стероїдної нейротоксичності у щурів із внутрішньомозковим крововиливом

Серед патобіохімічних складових при геморагічному ураженні головного мозку, поряд із кисневим дефіцитом, недостатньою оксигенацією нейронів, активацією анаеробного шляху утилізації глюкози, енергодефіцитом, порушенням кислотно-лужної рівноваги, окиснювального та нітрозативного стресу та апоптозом, чільне місце належить глутаматнійексайтотоксичності. За фізіологічних умов глутамат виступає як один із основних збуджуючих нейротрансміттерів ЦНС, контролює клітинні та синаптичні функції, загибель клітин і виживаність, рухові функції, навчання та пам’ять. В той же час при ураженнях головного мозку, глутамат перетворюється на потужний нейротоксин, який викликає пошукодження та загибель нейронів і гліальних клітин. Неконтрольоване вивільнення глутамату супроводжеється надмірною стимуляцією глутаматних рецепторів, зокрема, іонотропнихNMDA-рецепторів тіл нейронів, що призводить до перевантаження останніх іонами Са2+ і Na+, порушенню сигнальних, метаболічних та енергетичних процесів, і як наслідок, збільшенню зони ушкодження мозку внаслідок відтермінованої загибелі нейронів [5,162].

Як показали результати наших досліджень, рівень глутамату в мозку псевдооперованих щурів становив 12,82±0,30 нмоль/мг (рис. 6.1).

Рис. 6.1. Вплив адемолу та препаратів порівняння на рівень глутамату в головному мозку щурів з моделлю внутрішньомозкового крововиливу (n=7, M±m). Достовірність відмінностей щодо групи псевдооперовані - \* (р<0,05); ВМК+0,9% NaCl - # (р<0,05)

На тлі гострого ВМК вміст глутамату підвищився в 2,45 рази відносно псевдооперованих щурів і склав 31,5±0,59 нмоль/мг протеїну.

Всі застосовані лікарські засоби запобігали стрімкому зростанню рівня глутамату в головному мозку щурів з ВМК, проте їх антиексайтотоксична активність була виражена в різній мірі. В групі тварин, які отримували адемол, рівень глутамату в мозку щурів з ВМК був найнижчим і становив 16,3±0,32нмоль/мг протеїну, що в 1,93 рази менше, ніж у тварин контрольної патології.На тлі дії німодипінуантиексайтотксична дія була незначно більшою, ніж у адемолу (рівень глутамату становив 14,75±0,27 нмоль/мг протеїну), однак відмінності між німодипіном та адемолом не сягали статистично вірогідних значеньАмантадину та магнію сульфат в меншій мірі попереджали збільшення глутамату в головному мозку щурів з ВМК: цей показник склав, відповідно, 17,7±0,39 та 22,0±0,42 нмоль/мг протеїну.

Отже, за антиексайтотоксичним ефектом при ВМК адемол в дозі 2 мг/кг в/в та німодипін і амантадину сульфат виявились співставними, а магнію сульфат їм статистично (p<0,05) поступався.

Інсульт, особливо важкого ступеня тяжкості, який перебігає із порушенням вітальних функцій організму, являє собою один потужний стресогенний чинник із активацією симпато-адреналової, гіпоталамо-гіпофізарної та нейроендокринної системи. На початку відновного періоду відбувається максимальна активація наднирників, що маніфестує наростаючі концентрації глюкокортикоїдів у крові. Якщо у найгостріший та гострий період інсульту для стабілізації гемодинаміки, зменшення набряку-набухання головного мозку, корегування церебрального кровоплину, великі гормональні рівні мали гомеостатичний та виключно позитивний вплив то, в подальшому, стан індукований надлишком глюкокортикоїдів (зокрема, імобілізаційний стрес при коматозному стані) трансформується у чинник, який є нейротоксичним для ЦНС.

Адемол є носієм актопротекторної активності, що реалізується через його антиадренергічну дію (неселективна блокада β-адренорецепторів) та спроможності впливати на морфо-функціональний стан наднирників. Зважаючи на це, було доцільним охарактеризувати вплив адемолу на рівень кортизолу, в якості маркера стероїдної нейротоксичності при ВЧК, як одного із механізмів нейропротекторної дії препарату (табл. 6.6).

Дослідження коливань рівнів кортизолу у щурів в умовах ВМК показав, що на 21-шу добу після відтворення інсульту, його рівень вірогідно підвищився відносно псевдооперованих тварин в середньому у 5,85 разу (табл. 6.6). Беручи до уваги той факт, що рівень кортизолуверифікували в сироватці крові сагітального синуса головного мозку тварин, можна з високою вірогідністю стверджувати про факт стероїдної нейротоксичності.

Наростання рівнівнейроглюкокортикоїдів має цитоморфогенетичний вплив на функціонування та диференціацію нейронів ЦНС. При інсульті, підвищеному рівню кортизолу відповідає зменшення кількості гіпокампальних нейронів зони СА1, апоптоз, погіршення неврологічного статусу, формування коматозного стану, погіршення мнемотропної діяльності та висока смертність.

Таблиця 6.6

Вплив адемолута референс-препаратів нарівенькортизолу у сироватці крові сагітального синуса щурів із внутрішньомозковим крововиливом у відновний період інсульту (21-ша доба), M±m(n=7)

|  |  |
| --- | --- |
| Групи тварин | Рівень кортизолу, нг/мл |
| Псевдооперовані тварини + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг | 109,03±7,04 |
| ВМК + 0,9% NаСІ, 2 мл/кг(група контрольної патології) | 638,27±19,53 º |
| ВМК **+** адемол, 2 мг⁄кг, | 198,21±10,39 º\*#&α |
| ВМК + німодипін,30 мкг⁄кг | 300,01±21,41 º\*#& |
| ВМК + амантадину сульфат, 10 мг⁄кг | 391,34±11,70 º\*# |
| ВМК + магнію сульфат, 250 мг⁄кг | 520,56±11,30 º\* |

Примітки:

1. º – р<0,05 відносно псевдооперованих тварин;

3.\* – р<0,05 відносно контрольної патології;

4. # – р<0,05 відносно магнію сульфату (250 мг/кг);

5. &– р<0,05 відносно амантадину сульфату (10 мг/кг);

6. α – р<0,05 відносно німодипіну.

Лікувальне курсова інфузія щурам із ВМК адемолу умовно-ефективною дозою 2 мг/кг в/в, достовірно ліпше за решту референсів протидіяло наростанню глюкокортикоїдноїнейротоксичності, що проявилось у помірному підвищенню рівнякортизолу відносно псевдооперованих тварин, у той час, як на тлі препаратів-порівняння наростання кортизолу виявилось значно вищим (у рази). Так, наприкінці експериментальної терапії інсульту адемолом, вміст досліджуваного гормону в сироватці крові сагітального синуса зменшився відносно групи контрольної патології в середньому у 3,22 рази (р<0,05). Такий фармакодинамічний ефект адемолу свідчить про наявність у нього позитивного модулювального впливу на формування стероїдної нейротоксичності. При цьому, в умовах ВМК за здатністю знижувати вміст досліджуваного гормону, інфузіяадемолу, по ефективності вірогідно переважала німодипін в середньому в 1,51, а амантадину та магнію сульфат відповідно у 1,97 і 2,63 рази.

Антистероїдний ефект адемолу в умовах ВЧК, може бути одним із патогенетичних механізмів його церебропротекторної дії у відновний період інсульту.

## Висновки до розділу 6

До механізмів нейропротекторної дії адемолу в умовах ВЧК, окрім спроможності препарату покращувати церебральну перфузію, знижувати підвищений ВЧТ, послаблювати процеси нейроцитолізу, нейроапоптозу, нейропроліферації та стероїдної нейротоксичності відносяться його здатність на прикладі гострого періоду САК: ліквідувати енергодефіцит мозку (збільшення вмісту в мозку АТФ, пірувату та покращення енергетичного заряду відносно зразків контрольної патології в середньому відповідно на 45,1, 42,9 та 22,0 %, р<0,05); зменшувати лактат-ацидоз (зменшення вмісту лактату на 31,9 %, р<0,05), оксидативний стрес (зниження рівня малоновогодиальдегіду та КГП в середньому на 30,5 та 18,8 %, на тлі зростання активності СОД, ГПО і каталази відповідно на 42,1, 25,2 та 37,6 %, р<0,05), модулювати обмін монооксиду азоту (підвищення активності NO-синтази при паралельному збільшенні вмісту донатора NO L-аргініну в середньому відповідно на 14,0 та 44,0 %, р<0,05). За зазначеними властивостями адемол вірогідно перевершував ефективність амантадину та магнію сульфат. За спроможністю послаблювати явище глюкокортикоїдноїнейротоксичності по деескалації сироваткового рівня кортизолу в умовах ВМК адемол вірогідно переважав дієвість німодипіну та амантадину і магнію сульфату в середньому відповідно у 1,51, 1,97 та 2,63 рази, р<0,05.

# РОЗДІЛ 7

**АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Адемол – це лікарський препарат, рецепторна мішень якого описується β-адреноблокувальною активністю та модулювальним впливом на поліаміновий сайт NMDA-рецепторно-іонофорного ансамблю, що формує його основні фармакодинамічні параметри, такі як утеростимулююча, церебро-, кардіо- та актопротекторна, ноотропна, антиамнестична, антигіпоксична, знеболююча, анксіолітична і транквілізуюча дія [11]. Нейропротекторні властивості адемолу на етапі доклінічної оцінки виявлялись на моделях, що є аналогами клінічних форм нейро-судинної патології, а саме ІІ та транзиторних ішемічних атак, черепно-мозкової травми. Дієвість адемолу в умовах геморагічних інтракраніальних уражень (САК або ВМК), раніше не вивчались, що і стало об’єктом і предметом даного дослідження.

Оскільки модель ВМК, є валідизованою та широко апробованою із задовільними критеріями до відтворення в типових лабораторних умовах, створювати нову сенсу немає. Таким умовам не відповідають відомі нам моделі САК, тому на першому етапі було вирішено апробувати створену на базі ННДЛ «Фармадар» модель САК, яка б задовольняла всім умовам доклінічної оцінки та розробити критерії класифікації на ступені важкості в залежності від об’єму крові уведеній у субарахноїдальний простір [129].

Первинний скринінг церебропротекторної дії у адемолу проведено в умовах експериментального САК, який згідно літературних даних [128], на відміну від ВМК важкого ступеня тяжкості, спричиненого введенням у внутрішню капсулу головного мозку аутокрові, відзначається більш агресивним перебігом, а прогноз виживаності несприятливий. Саме такі жорсткі умови, є сприятливими для виявлення протекторної дії на головний мозок у тестованого препарату, або біологічно-активної сполуки, оскільки відсутність масштабного ураження ЦНС не дає змогу повною мірою та повноцінно виявити факт наявності чи відсутності нейропротекторної активності, як такої.

Таким чином, характеризуючи результати проведеного дослідження присвяченого скринінгу церебропротекторної активності з подальшою оцінкою ступеня виразності цього ефекту у промислового зразка розчину адемолу, порівняно із референсними препаратами німодипіном, амантадином або магнію сульфату на двох моделях ГІ, а саме САК та ВМК, можна зробити висновок, що досліджуваному похідному адамантану притаманний виразний захисний вплив на ішемізований головний мозок. За своєю ефективністю адемол умовно-ефективною дозою 2 мг/кг довенно вірогідно переважав розчини магнію сульфату, амантадину сульфату (48 год ВМК), не поступаючись німодипіну. При експериментальному САК у щурів, застосування 1,0 % розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемол) у діапазоні доз від 1 до 5 мг/кг сприяло підвищенню виживаності щурів, яке мало для всіх досліджуваних доз вірогідне (р<0,05) значення на 72 год інсульту. За інфузіїадемолу із розрахунку 1 або 5 мг/кг летальність зменшилась в середньому на 60%, а при застосуванні 2 мг/кг на 70 % відповідно і за своєю ефективністю співставлялась із німодипіном (30 мкг/кг), перевершуючи ефективність амантадину сульфату (48 год ВМК) та магнію сульфату у всі періоди спостереження [130].

Сумарними, підсумковими показниками, що дозволяють оцінити якість захисної дії потенційного нейропротектора на ішемізований головний мозок в умовах ВЧК, окрім його впливу на виживаність тварин, є покращання неврологічного статусу в динаміці, що проявляється регресом неврологічного дефіциту та збереженням мнемотропної активності. Саме тому за динамікою неврологічного статусу тварин, було доцільним дати порівняльну оцінку впливу терапії адемолом та референс-препаратами в умовах різних підтипів геморагічного інсульту.

За виявленим неврологічним дефіцитом у критичний період САК можна побудувати наступний варіаційним ряд в порядку наростання балів за шкалою С.Р. McGraw, що віддзеркалює величину нейропротекторної активності. Чим лівіше (ближче до групи псевдооперованих щурів) розташовується препарат, тим вищий у нього захисний вплив на головний мозок: псевдооперовані щури >адемол>німодипін = амантадину сульфат > магнію сульфат.

Результати 21-но денної терапії САК, похідним адамантану засвідчили, що за ступенем деескалації неврологічної симптоматики адемол вірогідно переважав ефективність розчинів амантадину та магнію сульфату в середньому у 1,34 та 1,51 рази , а варіаційний ряд тотожний із таким, що мав місце на 4-ту добу ВМК.

Згідно отриманих даних стосовно мнемотропної активності, традиційно можна побудувати наступний варіаційним ряд в порядку змішання латентного періоду входу в темну камеру, що віддзеркалює величину ноотропного ефекту, який є складовою церебропротекторної дії. Як і в попередніх випадках, проілюстрованих вище, чим лівіше (ближче до групи псевдооперованих щурів) розташовується препарат, тим вищий у нього захисний вплив на головний мозок: псевдооперовані щури >адемол>німодипін>амантадину сульфат > магнію сульфат.

Резюмуючи отримані дані стосовно впливу досліджуваних церебропротекторів на динаміку поліпшення неврологічного статусу та відновлення мнестичних функцій у щурів із модельним САК або ВМК можна зробити висновок, що за своєю ефективністю адемол умовно-терапевтичною дозою 2 мг/кг довенно вірогідно переважав дієвість амантадину та магнію сульфату, співставлючись при цьому з німодипіном. При цьому, за ноотропною активністю в тесті УРПУ, адемол вірогідно перевершував усі референсні препарати, у тому числі і німодипін [152].

Відомо, що провідними механізмами в патогенезі розвитку САК поряд із розладами загальної та церебральної гемодинаміки, виступають реакції запалення, набряку, а також зміна фізико-хімічних властивостей крові, зокрема, агрегації формених елементів, в’язкості, та ін. [163-167] Провідне місце посідає рефлекторний вазоспазм, особливо судин кори басейну середньої мозкової артерії, що призводить до формування тотальної церебральної ішемії та масивної нейродеструкції [168–170]. Серед багатьох механізмів захисної дії деяких церебропротекторних засобів, які використовуються для лікування гострої церебральної ішемії, зокрема в умовах ВЧК, провідне місце посідає спроможність препарату покращувати мозковий кровообіг за рахунок ліквідації, або послаблення вазоконстрикторних реакцій [171–174]. У попередніх дослідженнях, нами продемонстровано та доведено наявність у адемолустимулювальної дії на мозковий кровоплин в басейні внутрішньої сонної артерії при ГПМК за ішемічним типом [12,107,116,175]. Отримані дані стали підґрунтям для вивчення впливу адемолу на церебральну гемодинаміку в корі головного мозку при ВЧК як одного із можливих механізмів його нейропротекторної дії.

Отож, резюмуючи отримані результати можна зробити наступні послідовні висновки. Введення у попередньо катетеризований субарахноїдальний простір гепаринізованоїаутокрові об’ємом 0,1 мл/100 г у перші 96 год супроводжується двократним зменшенням рівня кортикального кровоплину головного мозку. Курсова інфузія щурам із модельним ВЧК 1,0 % розчину адемолу та референс-препарату німодипіпіну дозами відповідно 2 мг/кг та 30 мкг/кг сприяло збільшенню в середній мозковій артерії об’ємної швидкості мозкового кровоплину, амортизувала падіння кортикальної перфузії, стабілізуючи її рівень на значеннях мікроциркуляції більших за такі у групі контрольної патології в середньому в 3,99 та 2,76 рази (ВМК) і у 7,30 та 4,74 разу відповідно при САК, р<0,05 [131].

Черепна коробка являє собою замкнуту систему, в якій оповитий м’якою та твердою оболонками міститься головний мозок. В підпавутинному просторі знаходиться ліквор, який перебуває під постійним тиском, виконуючи трофічну та амортизуючу функцію. Продукується він судинними сплетеннями четвертого шлуночка мозку. Сталість ВЧТ забезпечується динамічною рівновагою між кількістю утвореного та резорбованого ліквору, а також постійністю просторових координат в яких він циркулює. Ішемічно-гіпоксичне ураження головного мозку, будь-якого ґенезу (інсульт, травма тощо), неодмінно призводить до зростання ВЧТ внаслідок розбалансування між утворенням та всмоктуванням ліквору в бік першого, що супроводжується набряком-набуханням мозку. Навіть при незначному зростанні ВЧТ, ліквор тисне на мозок, що неодмінно призводить до транслокації або його, або окремих структур. Логічно, що відкрита черепно-мозкова травма за рахунок порушення цілісності черепних покривів призводить до ліквореї, маючи більш сприятливий перебіг ніж закрита. Аналогічним чином, ІІ та ВМК без тенденції до наростання свого первинного об’єму, внаслідок мінімальних зрушень у ліквородинаміці асоціюються із відносно кращим прогнозом ніж потрапляння крові у субарахноїдальний простір (субарахноїдальний крововилив). Останній випадок, завжди супряжений із суттєвим підвищенням ВЧТ за рахунок крові у лікворі, і чим більший об’єм останньої, тим вищі цифри ВЧТ, і тим гірший прогноз для пацієнта. У більш пізній (відновний) період САК утворюються септи, котрі додатково порушують лікворообіг та сприяють сталості високих цифр ВЧТ. Таким чином, із патогенетичної точки зору, одним із альтеруючих чинників при САК є підвищений ВЧК. Пряма пошкоджуючи дія останнього пов’язана із тим, що, по-перше: ліквор під все більш наростаючим тиском безпосередньо баростатично деструктивним чином впливає на нейрони. По –друг: із крові виділяються біологічно-активні речовини, дія яких направлена на вазоконстриктцію з метою припинення крововиливу через уражену судину. От тільки така вазоконстрикція, носить не однойменний характер відносно судини винуватиці мозкової катастрофи, а має тотальний характер, залучаючи всі церебральні капіляри артеріального типу, спричиняючи тим самим тотальну ішемію мозку. Цьому, також сприяє факт безпосереднього перетискання ззовні артеріол мозку гематомою, рідкою кров’ю, або надмірною кількістю ліквора під тиском. Свою роль у формуванні підвищеного ВЧТ відіграє венозний стаз, колабування венозного тонусу (атонія вен), застій крові у венозних синусах та мальпігієвих судинах. З одного боку, це зменшує об’єм та утруднює резорбцію ліквору підпавутинними сплетеннями, а з іншого, зростання гідростатичного тиску та від’ємна різниця між його значеннями на межі: артеріальний кінець – венозне коліно, сприяє виходу рідкої частини плазми у міжнейрональний простір, діапедезу еритроцитів та завершується формуванням феномену набряку-набухання мозку. У важких випадках (тяжкий САК) діапедез еритроцитів супроводжується імбібіцією останніми тканини мозку з утворенням вогнищ ВМК. Феномен набряку-набухання складається із двох, на перший погляд, схожих процесів набряку та набухання. Проте, набряк – це накопичення рідини (транссудату) у міжнейрональному просторі. На противагу цьому, набухання торкається виключно внутрішньоклітинного простору, супроводжується збільшенням об’єму нейронів внаслідок порушення проникності зовнішньої мембрани та дисонансу в роботі іонних насосів. В основному, мембранні зміни асоційовано із оксидативним стресом та явищами ліпопероксидації, які відбуваються саме в мембранах.

Для повноцінної функціональної оцінки величини нейропротекторної активності адемолу при САК необхідно обов’язково з’ясувати, яким чином він впливає на показник ВЧТ у цих конкретних умовах. Покращення мозкового кровоплину та зменшення секвестрації крові, особливо у венулах м'якої мозкової оболонки та задовільний кровобіг через мальпігієві судини, що анастомозують кору із підкірковими капілярами, послаблюють набряк-набухання мозку та гіперпродукцію ліквору. Все це, очевидно, має сприяти зменшенню ВЧТ, що само по собі буде ліквідувати надмірний тиск ліквору на арахноїдальні судини та капіляри кори. Встановлено, що лікувальне введення адемолу в організм щурів із САК важкого ступеня сприяє зменшенню ВЧТ відносно тварин групи контрольної патології в середньому в у 2,88 рази. Паралельно, терапія референснимнімодипіном, який за величиною своїх нейропротектоних якостей, із поміж інших препаратів порівняння, найбільшою мірою співвідноситься із адемолом, сприяє деескалації цього показника гірше ніж адамантан, поступаючись останньому в середньому у 1,27 рази, р<0,05 [176].

На нашу думку, поєднання лікворогіпотензивного ефекту адемолу, який сягає достовірних значень, з описаними раніше церебропротекторними властивостями та стимулювально дією на мозковий кровоплин [107,119], вигідно відрізняють цей лікарський засіб поміж інших препаратів із аналогічною спрямованістю. Зазначені якості є особливо цінними в ургентній неврологічній практиці, де від швидкості та якості стабілізації підвищеного ВЧТ і захисту мозку від постреперфузійних уражень залежить подальше якісне функціонування останнього.

Відомо, що за своєю структурою молекула адемолу має подібність до відомого β-адреноблокаторапропранололу, що давало змогу до певної міри пояснювати його кардіопротекторну дію та здатність знижувати ВЧТ, що було показано за умов ІІ [10]. Однак роль цього напрямку дії адемолу на моделі ВЧК залишається досить дискутабельною. Так з’явились дані щодо негативних результатів застосування бета-адреноблокаторів на виживаність хворих із мозковими інсультами на тлі артеріальної гіпертензії [177], однак є також літературні дані, згідно яких бета блокатори не викликають збільшення смертності у таких хворих, а їх превентивне застосування попереджає рефлектонийвазоспазм після субарахноїдального крововиливу [178-180]. Але в одному всі фахівці одностайні – це питання потребує додаткових досліджень.

Відомо, що блокада β­адренорецепторів призводить до зниження ВЧТ за рахунок зменшення лікворопродукції. Причому ця дія реалізується не тільки за рахунок блокади β­адренорецепторів, а й внаслідок активуючого впливу β­адреноблокаторів на функціонування 5­гідрокситриптамінових рецепторів (5­ГТ) венул синусів та мальпігієвих судин [182]. Цей механізм лежить в основі покращення відтоку ліквору та венозної крові, що сприяє зниженню ВЧТ. Враховуючи вищенаведені факти, доцільно зробити припущення, щолікворогіпотензивна дія адемолу може бути пов’язана з його впливом на 5­ГТ рецептори венул синусів та мальпігієвих судин, однак це потребує відповідних досліджень.

Варто відмітити, що адемол є неселективним β-адреноблокатором без внутрішньої симпатоміметичної активності, що підтверджується відсутніми змінами на аритмограмах у вигляді брадикардії при реєстрації функціональних параметрів. Цим можна пояснити гемодинамічні особливості дії адемолу, у вигляді стабілізуючого впливу на параметри артеріального та центрального венозного тиску, а саме відсутність у нього гіпотензивного ефекту через зниження серцевого викиду, як у типових β-адреноблокаторів. В цьому контексті, дія адемолу асоційована із ефектами на молекулярними рівні, а саме наявним модулювальним впливом на систему монооксиду азоту, що і було доведено, описано та проаналізовано нижче. Стимулююча активність адемолу на показники інтракраніальної перфузії описується позитивною дією препарату на баланс в судинах NO та активність однойменної синтази. Саме такі ефекти для адемолу було встановлено та описано при доклінічній оцінці його ефективності в умовах ІІ [10]. Контроль гемодинамічних параметрів передбачав реєстрацію показника, зміни якого напряму пов’язано із розвитком гіпоксії внаслідок порушення доставки кисню через артеріолоспазм. Мова йде про ступінь насичення крові киснем, який верифікує наявну тканинну гіпоксію. Для адемолу раніше вже було встановлено та деталізовано антигіпоксичну дію, проте не в умовах ВЧК. Крім того, механізм такого фармакодинамічного ефекту проілюстровано не було. Ми дослідили зміни сатурації при інтракраніальному крововиливі, знайшли підтвердження протигіпоксичного церебрального ефекту у адемолу та дійшли висновку, що це пов’язано із притаманним для похідного адамантану впливом на кровотік.

Зважаючи на важливість моніторингу неймаркекрів у різні періоди ГПМК та притаманну для адемолуцеребропротекторну активність на різних моделях ВЧК, є всі підстави сподіватись на наявність у його мембрано-(цито)протекторних властивостей, як важливої складової його захисної дії на ішемізований головний мозок за цих умов. Відомо, що інтрацеребральнагеморагія супроводжується значними деструктивними змінами в цитоархітектонічній організації нервової тканини головного мозку [151,183,184]. Це закономірно знаходить своє віддзеркалення у стрімкому зростанні одного із маркерів порушення мембранної цілісності нейронів – NSE. При доклінічній оцінці адемолу та, в подальшому при його клінічних випробовуваннях як нейропротекторного засобу в умовах ІІ, наведено детальну характеристику цього нейромаркера у різні періоди ГПМК та проаналізовано взаємозв’язок енолазної активності з летальністю та неврологічним статусом. Тому, доцільно було дослідити вплив адемолу на особливості коливання титрів NSE у щурів на тлі різних за важкістю моделях ВЧК та охарактеризувати ці зміни відповідно до динаміки виживаності тварин, регресу наявного невролічного дефіциту та ноотропної дії [185–187].

На нашу думку, позитивна динаміка активності NSE на тлі курсового введення адемолу вказує на його здатність перешкоджати розвиток деструктивних змін в ішемізованому мозку, сприяти збереженню структурної цілісності нейронів, і як наслідок, зменшувати вогнище ішемії та зону пенумбри. Це, у свою чергу, супроводжується зниженням летальності тварин та більш швидшим регресом негативної неврологічної симптоматики (див. розділ 3). Важливим є те, що цитопротекторні ефекти адемолу однаково проявились, як у гострому, так і у відновлювальному періоді інсульту. Отже, для панорамної картини динаміки перебігу інсульту, доречною є не тільки порівняльна міжгрупова оцінка стосовно енолазноїативності, а й співставлення її абсолютних значень на 4-ту та 21-шу добу у кожній групі. Закономірно, паралельно до формування адаптаційних реакцій в ішемізованому головному мозку (розкриття колатералей, тощо) відбувається послаблення активності NSE у відновному періоді проти гострого. Цей феномен має місце навіть у групі контрольної патології і носить вірогідний характер: активність енолази проти 4-ої доби в кінці досліду виявилась втричі меншою. Проте, на тлі терапії досліджуваними цитопротекторами такий регрес був більш масштабним. Так, станом на 21-шу добу ВМК на тлі німодипіну та амантадину сульфату зафіксовано зменшення активності енолази проти гострого періоду відповідно у 3,89 та 4,0 рази, р<0,05. Потужна динаміка деескалації активності досліджуваного нейромаркера мала місце на тлі курсового застосування адемолу, коли її титри наприкінці терапії виявились нижчими за дані станом на 4-ту добу в середньому у 4,01 рази, що є співвідносним із ефективністю розчину амантадину сульфату. Найгірша динаміка регресу у відновний період ВМК відмічена при застосуванні розчину магнію сульфату – в середньому у 3,27 рази (р<0,05), що наближалось до картини, яка характерна для групи контрольної патології.

Таким чином, наведені факти свідчать про спроможність адемолу сприяти збереженню нейроцитоархітектоніки при модельній інтрацеребральнійгеморагії, що знайшло відповідне цитометричне підтвердження [188].

Дослідження превалювання одних процесів клітинної смерті над іншими (некробіоз, апоптоз) та оцінка внеску кожного окремого у формування ішемічного вогнища при ГПМК – питання, вирішення якого має важливу практичну цінність для розробки нових методів патогенетичної терапії інсульту. Не менше значення має оцінка церебропротекторного впливу препаратів на модуляцію типів елімінації клітинних елементів ЦНС (нейронів) та можливість трансформації запрограмованих (апоптоз) і спонтанних (некроз) видів нейродеструкції. Відомо, що нейронекроз (нейроцитоліз) являє собою лавиноподібний, хаотичний процес деструкції клітин, який супроводжується запальною відповіддю у відновний період. Принциповою відмінністю нейроапоптозу від некробіозу, є обмеженість цього явища кожною окремо взятою клітиною, збереженням мембранної (цитоархітектонічної) цілісності, за рахунок чого відсутнє запалення. Отже, загибель клітини шляхом апоптозу не супроводжується порушенням мембранної єдності нейронів, які поступово втрачають більшу частину цитоплазми з подальшим утворенням апоптотичних тілець, котрі фагоцитуються. Саме тому, апоптотична загибель нейронів має не тільки кількісні, а й якісні переваги перед онкозом, і є «меншим злом» для високоспеціалізованого органу або системи із диференційованими клітинними елементами, загалом, не зважаючи на підсумкове зменшення нейронального пулу. Поряд із цим, згідно думки певної когорти науковців [189–191], при інсульті процеси апоптотичної загибелі клітин переважають над некротичними, і апоптотичні тенденції мають негативний відтінок через те, що останній може індукувати фактори відстроченого екстра ексайтотоксичного враження нейронів. Згідно такого тлумачення, провідним напрямком нейропротекції можна вважати розробку та клінічне застосування лікарських засобів антиапоптотичної дії. В такому разі, попередження апоптозу, у своїй більшості, логічно вважається доцільним, що на думку вчених, може мати ґрунтовний зміст для реалізації церебропротекції [59,189,192]. Проте відомо, якщо необоротно уражені нейрони втрачають змогу бути елімінованими шляхом апоптозу, це слугує стартом для запуску механізмів некрозу і є небажаним, оскільки при останньому відбувається експансія зони ішемії за рахунок приєднання до вогнища пенумбри додаткових клітин [189, 193–195]. Таким чином, на нашу думку, можна зробити заключення, що виключна превенція запрограмованих шляхів клітинної смерті в умовах ВМК по апоптотичному типу – еволюційно застарілий напрямок церебропротекції, а перспективним є впровадження препаратів, які дозволяють одночасно гальмувати усі можливі шляхи клітинної смерті ( апоптоз, некробіоз) [59].

На основі отриманих даних можна зробити наступні висновки. По-перше, лікувальне введення адемолу дозою 2 мг/кг в/в, так само, як і німодипіну (30 мкг/кг в/в), чинить позитивну модулюючую дію на процеси нейроапоптозу в корі головного мозку щурів з ВМК. По-друге, спроможність адемолу, подібно до референсу зменшувати % апоптотичних нейронів в корі головного мозку щурів із ВМК може бути одним із механізмів їх церебропротекторної дії. Зважаючи на виражені антицитолітичні та антиапоптотичні властивості адемолу в умовах ВМК, його можна віднести до первинних нейропротекторів, що робить препарат перспективним для патогенетично спрямованого переривання ранніх механізмів клітинної смерті, і дає обґрунтовану можливість в майбутньому застосування на перших етапах судиномозкової катастрофи.

Формування нейродеструктивного вогнища в мозку при ВЧК – це динамічний процес, який в сукупності формується із явищ, котрі, на перший погляд, за своєю сутністю діаметрально протилежні. Наприклад так, одночасно відбувається руйнування мембран нейронів (нейроцитоліз), а паралельно, у відповідь ініціюютьсянейропроліферативні зміни, за рахунок поділу гліальних елементів, на кшталт репаративної відповіді нервової тканини, котра, як високо спеціалізована та високо диференційована не спроможна до повноцінного відновлення. Інтенсивність руйнування нейрональних мембран, конкордатне масиву нейрогліоцитів спроможних та готових до поділу. Якщо, енолаза віддзеркалює нейроцитоліз, і це можна кількісно оцінити, виявляючи зміни її активності, то нейропроліферацію, аналогічним чином, є змога виявити за допомого іншого нейромаркера –S100, який експерсуєтьсянейрогліальними елементами. Закономірно, чим більша кількість нейронів було зруйновано, тим інтенсивніше відбуваються процеси їх заміщення нейроглією, і тим вищі титри S100 ідентифікуються. S100, подібно до енолази – це нейромаркери, котрі використовуються в клінічних умовах для експрес оцінки важкості перебігу церебральної ішемії та корелюють із прогнозом для таких хворих крізь призму летальності та неврологічного статусу.

Нервова тканина є високоспеціалізованою системою, котру формують клітини з максимальним рівнем морфологічної диференціації – нейрони. Останні, як відомо не здатні до поділу і володіють низьким репаративним потенціалом. Єдиний клітинний елемент, який періодично відновлюється відносять до пулу нейрогліїї. Нейрогліоцити в ЦНС, як аналог сполучно-тканинних елементів в соматичній тканині, здатні до поділу, котрий у разі виходу поза межі фізіологічного профілю, ідентифікує попередню елімінацію нейронів. Тобто, нейрогліоцити заміщують нейрони, котрі загинули внаслідок некрозу. Відтак, активність нейроглії опосередковано свідчить про величину та масштаби нейродеструкції. Цей процес можна відслідкувати за допомогою імуноферментного аналізу за рівнем S100, котрий експресуєтьсянейроглією, що і було зроблено імуноферментним шляхом.

Максимальне використання всіх можливостей протоково-цитометричного аналізу при оцінці апоптотичної активності в ядерній суспензії, отриманої з клітин кори лобних долей головного мозку, повною мірою дає змогу верифікувати питому кількість ядерної ДНК у стані реплікаційної здатності, тобто такої, що готова до поділу. Встановлено, що в критичний період субарахноїдального крововиливу адемол за антинейрогліопроліферативним ефектом переважав референтсийнімодипін, що додатково засвідчує його спроможність зберігати морфологічну цілісність нейронів.

Отримані результати щодо нейропротекторної дії адемолу за маркерами нейроапоптозу, нейроцитолізу та нейродегенерації опубліковані в нашій роботі [196].

Для візуалізації масштабу морфо-дегенеративних явищ, котрі відбуваються в мозку за ВЧК на тлі церебропротекторної терапії, слід виконати оцінку гістопрепаратів, використавши можливості світлової мікроскопії.

Загалом, гістопатологічні зміни при лікуванні церебральної ішемії геморагічного ґенезу були помірними із збереженням структурної організації нервової тканини, кори мозку, гіпокампу та елементів мікроциркуляторного русла, а панорамний вигляд досліджуваного об’єкту мав вигляд, котрий за основними описовими оціночними критеріями (наявність/відсутність: ядра, ядерця, відростків нейронів та інших структурних клітинних об’єктів, перивазального та навколо клітинного набряку, діапедезу формених елементів крові, цитолізу, ознак нейродеструкції стінки) наближався до такого у псевдооперованих щурів, що відповідало фактам, які було отримано при імуноферментному досліджені нейроспецифічних ферментів.

При доклінічній оцінці протективних властивостей адемолу (промисловий зразок) з’ясовано, що біохімічні складові механізму його захисної дії на нейрони при ІІ, гіпоксичних станах різного ґенезу, черепно-мозковій травмі та перехідній ішемії зорового аналізатора, пов’язані із притаманним для похідного адамантанумодульовальним впливом на порушений внутрішньоклітинний гомеостаз метаболічного характеру (енергетичний, вуглеводний, оксидантно-антиоксидантний баланс, обмін монооксиду азоту, нітрозативний стрес, ацидотичний стан) та деструктивні процеси, такі як нейроапоптоз, некробіоз, нейропроліферація. Так, введення дослідним тваринам (щурі, кролі) із моделями перерахованих патологічних станів 1,0 % розчину адемолу дозою 2 мг/кг, достовірно краще відносно тварин контрольної патології сприяло відновленню енергетичного метаболізму і стабілізувало порушені показники обміну NO, надійніше профілактувало розвиток оксидативного стресу та перешкоджало морфо-дегенаративні явища в нейроцитах, одночасно забезпечуючи формування феномену нейрореставрації. За цими властивостями адемол перевершував такі референсні препарати, як цитиколін, мексидол, пірацетам, актовегін, нейропептиди (церебролізин, кортексин) та структурно подібні адамантани (р<0,05) [107]. Наведені аналітичні дані щодо притаманної адемолуметаболототропної активності в умовах ішемічно-гіпоксичного ураження нервової тканини, дають підґрунтя та роблять доцільним вивчення аналогічних ефектів у цього препарату і при САК, що і було показано в наших дослідженнях [152,197].

У ході проведеного динамічного дослідження впливу адемолу на енергетичний метаболізм у мозку щурів в гострий та відновний періоди ВМК встановлено, що біохімічні складові механізму його церебропротекторної дії в цих умовах асоційовано із відновленням енергопостачання останнього (збільшення вмісту АТФ, малату та пірувату) на тлі паралельного зменшення вмісту лактату. Ця ланка у фармакодинамічному аспекті захисної дії адемолу на ішемізований мозок є вкрай важливою, оскільки в аноксичних або ж гіпоксичних умовах, енергетичний потенціал нейронів швидко виснажується, а єдиним енергетичним субстратом при цьому виступає лише глюкоза. За спроможністю адамантану відновлювати енергетичний обмін у гострий та відновний періоди САК доцільно побудувати наступний варіаційним ряд в порядку наростання енергодефіциту за рівнем субстратів, які афілійовано з цим явищем, що віддзеркалює величину нейропротекторної активності. Чим лівіше (ближче до групи псевдооперованих щурів) розташовується препарат, тим вищий у нього енергетичний потенціал: псевдооперовані щури >адемол ≥ німодипін>амантадину сульфат > магнію сульфат > контрольна патологія.

Відновлення енергетичного балансу в умовах САК на тлі адемолу добре співствляється із зменшенням енолазної активності, яка віддзеркалює нейроцитоліз (нейронекроз). Справа в тому, що апоптоз, на відміну некрозу – це енергоємний, а значить залежний від наявного пулу АТФ процес. Коли рівень останнього зменшується, ініціація апоптотичних програм стає неможливою, а нейрон, маючи необоротні ультраструктурні пошкодження, гине виключно некротичним шляхом, що, з точку зору єдності цитоморфологічної організації ЦНС, є вкрай несприятливим. Відновлення запасів АТФ сприяє трансформації некротичного на апоптотичний тип, що і проявляється деескалацію активності енолази. Паралельно, нами встановлено, що адемол сприяє пригніченню і апоптотичних механізмів. Отже, досліджуваний препарат, більшою мірою завдяки нормалізації вуглеводного і енергетичного обміну, забезпечує цілісність та єдність структурної цілісності нейронів мозку в умовах САК.

Ураження клітин головного мозку за цих умов асоціювалось із розвитком дисбалансу в про- та антиоксидантних систем (зменшувалась активність СОД, ГПО та каталази), що супроводжувалось активацією процесів вільнорадикального окиснення ліпідів (зростав вміст МДА – вторинного продукту ліпопероксидації) та окисної деградації білків (збільшувався рівень КГП). Поряд з цим розвивався дисбаланс в системі L-аргінін / NO, а саме виникав дефіцит амінокислоти аргініну в клітинах мозку та збільшувалась продукція нітроген монооксиду за участі NO-синтази.

Таким чином, використання досліджуваних препаратів показало їх здатність достовірно зменшувати метаболічні розлади, індуковані ВЧК. Доведено, що нейропротекторна активність адемолу, певною мірою, пов’язана із його антиоксидантною дією, здатністю посилювати енергетичний обмін, покращувати супряження процесів тканинного дихання та окисного фосфорилування, активувати процеси аеробного окиснення глюкози, зменшувати лактатацидоз, відновлювати баланс в системі продукції нітроген монооксиду. За цими ефектами адемол за деякими показниками співставляється з німодипіном, перевершуючи решту препаратів порівняння.

Глюкокортикоїднанейротоксичність у відновному періоді інсульту – одна із клітинних мішеней для патогенетичного впливу на нього, а використання фармакологічних препаратів, які здатні протидіяти негативному впливу надлишкових концентрацій глюкокортикоїдів при цереброваскулярній патології – перспективний напрямок нейропротекції.

На основі отриманих даних стосовно змін сироваткових рівнів кортизолу у щурів із ВМК у відновний період інсульту (21-ша доба) можна побудувати наступний варіаційний ряд: псевдооперовані щури >адемол>німодипін>амантадину сульфат > магнію сульфат. В такому ряді той препарат проявляє найбільший антистероїдний вплив на головний мозок, через послаблення глюкокортикоїдноїнейротоксичності, який знаходиться ближче до групи псевдооперованих тварин. Таким чином, адемолу, порівняно з референтами, притаманна найбільша антиглюкокортикоїдна дія, що доводиться вірогідно потужнішим стабілізуючим впливом на ескалацію титрів даного гормону і це, очевидно, є одним із механізмів його церебропротекторної активності у розрізі формування феномену стероїдної нейротоксичності.

На рис. 7.1 зображено ймовірні шляхи метаболізму адемолу за принципом від менш полярних до більш полярних розчинних метаболітів. Оскільки простий естерний зв'язок досить міцний метаболізм адемолу може відбуватись за рахунок бічного ланцюга. Одним із ймовірних метаболітів в такому випадку є адамантіл-1-іл-оцтова кислота та 2-адамантантил-1-етанол, які екскретуються із сечею.

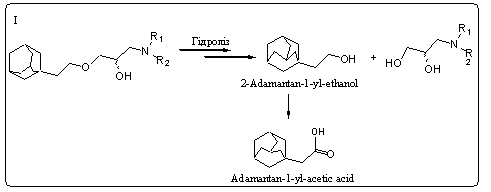


Рис. 7.1 Ймовірні шляхи метаболізму адемолу

Аналізуючи особливості хімічного каркасу (скелету) молекули адемолу, можливо намітити та передбачити ймовірні шляхи хімічної модифікації молекули адемолу та які функціональні групи необхідні для введення в цю структуру для посилення афінності до різних сайтів NMDA рецепторів із подальшою метою синтезу більш ефективного нейропротектора. Зіставляючи структуру адемолу і амантадину (1-адамантіламін), слід відмітити, що обидва препарати є слабкими антагоністами глутаматних NMDA-рецепторів та гальмують генерацію імпульсів в моторних нейронах ЦНС. Введення NH2-аминогрупи буде сприяти підсиленню описаного виду фармакологічної та рецепторної активності. Можна рекомендувати включити в молекулу залишки гліцину або глутамінової кислоти. На підтримку цієї тези стосовно наявної вільної аміно-групи безпосередньо пов'язаної із адамантановим каркасом вказують і дані про препарат із групи аміно-адамантанів – мідантан, який має ще більшу, ніж іони Mg2+тропність до каналу рецептора, а зв'язуючись із ним блокує процеси, пов'язані з входженням іонів кальцію в канал. Також можна рекомендувати до введення груп, які гіпотетично будуть хелатувати іони Mg2+ і не пускати їх в канал NMDA-рецепторів. Наприклад, радикал етилендіамін-тетраоцтової кислоти (залишок Трілону Б).

Метаболізм адемолу може відбуватись, як за рахунок бічного ланцюга із утворенням його метаболіту адамантіл-1-іл-оцтової кислоти і 2-адамантантил-1-етанолу, що екскретуються із сечею, так і внаслідок зв’язування адемолу із альбумінами плазми, що забезпечує альтернативний шлях метаболізму, який відбувається повільно в печінці завдяки наявності інертного адамантанового радикалу. Введення NH2-аминогрупи, залишків гліцину або глутамінової кислоти до каркасу молекули адемолу, буде сприяти посиленню його афінності, що підсилить нейропротекторну активність через більш повну та фізіологічну блокаду NMDA-рецепторів.

# ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено нове розв’язання актуального завдання фармакології, що полягає у підвищенні ефективності нейропротекції в умовах внутрішньочерепного крововиливу на підставі експериментально обґрунтованої доцільності і можливості застосування за новим призначенням блокатора NMDA рецепторів 1,0 % розчину 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемол).

1. Показано, що для первинного скринінгу перспективних нейропротекторів доцільно використовувати модель субарахноідального крововиливу, яка в залежності від об’єму введеної аутокрові може бути поділена на на три ступеня важкості: тяжкий ступінь (0,1 мл/кг аутокрові) – смертність 70 %, активність нейрон-специфічної енолази 4,89±0,14 нг/мл, неврологічний дефіцит за шкалою С.Р. McGraw 11,9±0,33 бали, внутрішньочерепний тиск 16,4±0,57 у.о; середній ступінь (0,07 мл/кг аутокрові) – смертність 30 %, активність NSE 3,31±0,09 нг/мл, неврологічний дефіцит 6,53±0,33 бали, внутрішньочерепний тиск 10,6±0,43 у.о.; легкий ступінь (0,05 мл/кг аутокрові) – смертність 20 %, активність нейрон-специфічної енолази 2,26±0,08 нг/мл, неврологічний дефіцит 5,07±0,28 бали, внутрішньочерепний тиск 7,57±0,37 у.о.
2. Аналізуючи показник летальності в критичний період (48 година) субарахноідального крововиливу тяжкого ступеня та внутрішньомозкового крововиливу середнього ступеня за ступенем церебропротекторної дії досліджувані препарати розташовані в наступний ряд: псевдооперовані щури >адемол 2 мг/кг >адемол 1 мг/кг = адемол 5 мг/кг >німодипін = амантадину сульфат > магнію сульфат. На підставі цього обрано умовно-ефективну дозу адемолу, яка становить 2 мг/кг довенно, оскільки в цій дозі препарат статистично вірогідно підвищує виживаність тварин в порівнянні з референтними засобами в середньому на 60,0-88,2 % (р<0,05), що вказує на перспективність і доцільність подальшої доклінічної оцінки його церебропротекторних властивостей.
3. У критичний періодсубарахноїдального крововиливу тяжкого ступеня адемол (2 мг/кг довенно) усуває прояви неврологічного дефіциту (показник за шкалою С.Р. McGraw був у 2,1 рази меншим ніж у групі контрольної патології, вірогідно переважав німодипін та амантадину сульфат у 1,22 та 1,35 рази, відповідно (р<0,05). У відновний період (21-ша доба) внутрішньомозкового крововиливу середнього ступеня важкості за ступенем деескалації неврологічної симптоматики адемол вірогідно переважає ефективність амантадину та магнію сульфату в 1,34 та 1,51 рази відповідно, більш виразно покращує мнемотропну активність за показниками тесту умовної реакції пасивного уникання порівняно з препаратами порівняння.
4. Курсова 4-х денна інфузія щурам із модельним внутрішньочерепним крововиливом 1,0 % розчину адемолу (2 мг/кг) та німодипіну (30 мкг/кг) попереджає падіння мозкової перфузії (коефіцієнт мікроциркуляції в корі перевищував показник контрольної патології в середньому в 3,99 та 2,76 рази (внутрішньомозковий крововилив) і у 7,30 та 4,74 разу відповідно (субарахноїдальний крововилив, (р<0,05), збільшує показник об’ємної швидкості мозкового кровотоку в центральній мозковій артерії відносно групи контрольної патології в середньому на 68,4 % (адемол) та 94,1 % (німодипін), р<0,05. На відміну від німодипіну, на тлі інфузіїадемолу показники центральної гемодинаміки (артеріальний та центральний венозний тиск), а також рівень насичення крові киснем не мають вірогідних відмінностей порівняно із вихідними рівнями, а за ступенем депримуючого впливу на значення внутрішньочерепного тиску в умовах субарахноїдального крововиливу адемол перевершує ефективність амантадину і магнію сульфату в середньому у 1,85 рази, р<0,05.
5. В критичний період субарахноїдального крововиливу адемол за величиною послаблення нейроцитолізу (за активністю нейромаркера нейрон-специфічної енолази) вірогідно переважає німодипін, амантадин та магнію сульфат в середньому у 1,57, 1,49 та 2,04 рази, виявляє при цьому антинейроапоптотичний та антинейрогліопроліферативний ефекти (за ступенем фрагментації ядерної ДНК та рівнем білка S100 і активацією фази синтезу ДНК), переважаючи німодипін в середньому на 13,0 % (апоптоз), та у 1,35 та 1,68 рази (нейропроліферація за титрами білка S100 і протоково-цитометричним критерієм), р<0,05.

За даними світлової мікроскопії, гістоморфологічна картина на тлі терапії адемолом і німодипіном має вигляд, наближений до панорами у псевдооперованих щурів, що доповнює факти, які було отримано при імуноферментному та цитометричному досліджені.

1. Механізм нейропротекторної дії адемолу за умов внутрішночерепного крововиливу включає здатність ліквідувати енергодефіцит мозку (збільшує вміст в мозку АТФ, пірувату та покращує енергетичний заряд відносно показників нелікованих тварин відповідно на 45,1, 42,9 та 22,0 %, р<0,05); зменшувати лактат-ацидоз (зменшує вміст лактату на 31,9 %, р<0,05), оксидативний стрес (знижує рівень малоновогодиальдегіду та карбонільних груп протеїнів в середньому на 30,5 та 18,8 %, на тлі зростання активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і каталази відповідно на 42,1, 25,2 та 37,6 %, р<0,05), модулювання обміну монооксиду азоту (підвищує активність NO-синтази вміст донатора NO L-аргініну в середньому відповідно на 14,0 та 44,0 %, р<0,05). За зазначеними властивостями адемол вірогідно перевершує ефективність амантадину та магнію сульфат.
2. За антиексайтотоксичним ефектомадемол в дозі 2 мг/кг співставляється з такими ефектами німодипіну та амантадину сульфату, і був статистично вищим за дію магнію сульфату. В групі тварин, які отримували адемол, рівень глутамату в мозку щурів з внутрішньомозковим крововиливом становить 16,3±0,32 нмоль/мг протеїну, що в 1,93 рази менше, ніж у тварин контрольної патології (p<0,05). За спроможністю послаблювати явище глюкокортикоїдноїнейротоксичності (зниження сироваткового рівня кортизолу в умовах внутрішньомозкового крововиливу) адемол вірогідно переважає дієвість німодипіну та амантадину і магнію сульфату в середньому відповідно у 1,51, 1,97 та 2,63 рази, р<0,05.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Особенностиэпидемиологииинвалидност и при заболеванияхнервнойсистемы в Украине: клинико-экспертныесопоставления (10-летний украинскийопыт) / В. А. Голик и др.Укр. вісн. мед.-соц. експертизи. 2014. № 1 (11). С. 14–21.
2. Circumstances, activities, andeventsprecipitatinganeurysmalsubarachnoidhemorrhage / M. Matsudaetal. J. StrokeCerebrovasc. Dis. 2007. Vol. 16 (1). Р. 25–29.
3. Гузий А. В.[Академія інсульту: сучасні методи боротьби з інсультом в Україні та світі](https://www.umj.com.ua/article/164192/akademiya-insultu-suchasni-metodi-borotbi-z-insultom-v-ukrayini-ta-sviti) [Електрона публікація]//Укр. мед. часопис. 2019. [6 (1) (134). URL:](https://www.umj.com.ua/article/magazine/134-xi-xii-1)

<https://www.umj.com.ua/wp/wp-content/uploads/2019/11/AkadInsult_new.pdf?upload=> (дата звернення: 04.09.2020).

1. Boling B., Groves T. R. ManagementofSubarachnoidHemorrhage. CriticalCareNurse. 2019. Vol. 39 (5). Р. 58–67.
2. Бонь Е. И., Максимович Н .Е. Роль эксайтотоксичности в патогенезе повреждений головного мозга при ишемии. Вест. Смоленскойгос. мед. акад. 2019. Т. 18, № 1. С. 67–72.
3. Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка впливу похідних адамантанусполук ЮК-1 та ЮК-4 на активність NMDA-рецепторів. Клініч. фармація. 2011. Т. 15, № 4. С. 60–63.
4. Антагонистглутаматных NMDA-рецепторов (амантадина сульфат) в интенсивнойтерапиитяжелой черепно-мозговойтравмы / Черний В. И. и др.Мед. неотложныхсостояний. 2015. № 5 (68). С. 81–91.
5. Wu Q. J.,TymianskiМ. [TargetingNMDAreceptors in stroke: new hope in neuroprotection[Електрона публікація]](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29534733/)//Mol. Brain. 2018.Vol. 15. URL: <https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-018-0357-8>(дата звернення: 04.09.2020).
6. Abdel-Hamid A. A., FirganyAel-D., Ali E. M. Effectofmemantine: A NMDA recep-torblocker, onethambutol-inducedretinalinjury. Ann. Anat. 2015. Vol. 204. Р. 86–92.
7. Ходаківський О. А. Патогенетичне обґрунтування доцільності використання нових похідних адамантану при експериментальній терапії гострої ішемії головного мозку та міокарда (експериментальне дослідження) : автореф. дис. … д-ра мед. наук : 14.03.05. Одеса. 2014. 24 с.
8. Ходаковский А. А., Павлов С. В., Бухтиярова Н. В. Изучение апоптозмодулирующих свойств адемола в условиях модельного нарушения мозгового кровообращения по его влиянию на экспрессию генов раннего реагирования. Науч.ведом.БелГУ. 2013. № 11(154).Вып. 22. С. 155–159.
9. Ходаківський О. А. Характеристика протиішемічних та мнемотропних властивостей адемолу при модельному гострому порушенні мозкового кровообігу. Фізіолог. журн. 2013. Т. 59, № 5. С. 71–77.
10. Ходаківський О. А. Оцінка захисної дії на міокард нових похідних адамантану в умовах експериментального кардіогенного шоку. Вісн. морф. 2010. Т. 16, № 3. С. 564–568.
11. Засіб для лікування слабкості пологової діяльності (Адемол): пат. 53558 А Україна: МКІ 7 А61К9/08, А61К31/535; заявл. 18.07.2002; опубл. 15.01. 2003, Бюл. № 1. 4 с.
12. Повх В. Л. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на біохімічні зміни в сітківці при ішемічному та травматичному ураженні зорового аналізатора. Мед. та клін. хімія. 2018. № 20 (1). С. 136–141.
13. Адемол: новий підхід до церебропротекції / Г. І. Степанюк та ін. Вінниця : Нілан-ЛТД. 2018. 219 с.
14. Шведський В. В., Ходаківський О. А. Експериментальне порушення мозкового кровообігу на тлі алоксанового цукрового діабету: характеристика моделі. Буковин. мед. вісн. 2012. Т. 16, № 1 (61). С. 150–156.
15. Шведський В. В., Штриголь С. Ю., Ходаківський О. А. Сучасна церебропротекторна терапія гострих порушень мозкового кровообігу при цукровому діабеті та шляхи її оптимізації. Клін. фарм. 2011. Т.15, № 2. С. 7–12.
16. Особенностисостояниямикроциркуляции у пациентов с острымишемическиминсультом и хроническойишемией головного мезга / А. В. Анисимова и др. Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. 2015. № 3. С. 27–32.
17. Матвеева Н. А., Мартынов М. Ю., Фаворова O. O. Ишемическийинсульткаккомплексноеполигенноезаболевание / Б. В. Титов и др. Молекул. биолог. 2015. № 2. С. 220–224.
18. Максимова М. Ю.,Комелкова Л. В., Охтова Ф.Р. Факторы межклеточного взаимодействия в остром периоде ишемического инсульта. Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. 2014. №114 (2). Р. 15–20.
19. Роль оксидаазота и эндотелина-1 в развитииишемических нарушений мозговогокровообращения / А. Ю. Рябченко и др. Неврол. вестн. журн. им. В. М. Бехтерева. 2014. № 1. С. 34–37.
20. Seifert G., Schilling K., Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. Nat. Rev.Neurosci. 2006. Vol. 7(3). Р. 194–206.
21. Малахов В. О., Личко В. С., Грецьких К. В. Гематоенцефалічнийбар’єр як частинанейроімунноендокринноїсистеми. Укр. неврол. журн. 2014. № 1. С. 25–30.
22. Морфологічні особливості головного мозку щурів при гострій церебральній ішемії на фоні введення 0, 9% розчину NaCl / А. І. Семененко та ін. Вісн. морфол. 2015. Т. 21, № 1. С. 64–69.
23. Особливості морфології головного мозку щурів при гострій церебральній ішемії на тлі уведення волювену / А. І. Семененко та ін. Буковин. мед. вісн. Т. 19, № 1. С. 137–141.
24. Бонь Е. И., Максимович Н. Е. Морфологические представления о кровообращении головного мозга крысы. Вест.Витеб.гос. мед.ун-та. 2018. Т. 17, № 2. С. 30–36.
25. Сохор Н. Р. Клініко-гемодинамічні особливості різних підтипів ішемічного інсульту у гострому періоді. Укр. вісн. психоневр. 2015. Т. 23, № 2 (83). С. 26–31.
26. Энергетическийметаболизммозга и металло-лигандный гомеостаз в этиопатогенезеишемическогоинсульта / Л. Л. Клименк и др. Микроэлем. в мед. 2015. № 2. С. 18–27.
27. ActivationoftheNeuroprotectiveAngiotensin-ConvertingEnzyme 2 inRatIschemicStroke / D. M. Bennionetal. Hyperten. 2015. Vol. 66 (1). Р. 141–148.
28. Acuteischemicstroketreatment. Part 1: patientselection «the 50% barrierandthecapillaryindexscore» / F. Al-Ali etal. FrontNeurol. 2015. Vol. 22 (6). Р. 83–89.
29. Beynon S.B., Walker F.R. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology.Neurosc. 2012. Vol. 225. P. 162–171.
30. Свістільнік Т. В. Феномен ексайтотоксичності. Механізми виникнення, значення в розвитку нейронального пошкодження та можливості його корекції при патологіях ЦНС. Biomed. andbiosoc. аnthrop. 2013. Vol. 20. С. 207–215.
31. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation / Á.[Chamorro](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chamorro%20%C3%81%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27180033)etal. [Lancet Neurol.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180033) 2016. Vol. 15 (8). P. 869–881.
32. [Caceres](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Caceres%20JA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22974648)J. A, [Goldstein](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Goldstein%20JN%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22974648) J. N. IntracranialHemorrage. [EmergMedClinNorthAm. 2012. Vol. 30 (3). Р. 771–794.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&retmode=ref&cmd=prlinks&id=22974648)
33. Aronowski J., Zhao X. [Molecularpathophysiologyofcerebralhemorrhage: secondarybraininjury.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527759/)Stroke. 2011. Vol. 42 (6). Р. 1781–1786.
34. Oxidativestressandparaoxonase 1 statusinacuteischemicstrokepatients / J. Kotur-Stevuljevicetal. Atherosclerosis. 2015. Vol. 241 (1). Р. 192–198.
35. LauA., TymianskiM. Glutamatereceptors, neurotoxicityandneurodegeneration.Pflugers Arch.2010. Vol. 460. Р. 525–542.
36. Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischemia induced neurotoxicity / Brassai A. etal. Brain Res. Bull. 2015. Vol. 112. P. 1–6.
37. Sanderson T. H. Raghunayakula S., Kumar R. Neuronalhypoxiadisruptsmitochondrialfusion. Neurosc. 2015. №3 (301). Р. 71–78.
38. ScarpullaR. C. Nucleus-encodedregulatorsofmitochondrialfunction: integrationofrespiratorychainexpression, nutrientsensingandmetabolicstress.BBA- GeneRegulatoryMechanisms. 2012. 1819 (9–10). Р. 1088–1097.
39. ChoiD. W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent.Neurosci Lett.1985. Vol. 58. Р. 293–297.
40. Kristián T., Siesjö B. K.[Calciuminischemiccelldeath.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9506616/)Stroke. 1998. Vol. 29 (3). Р. 705–718.
41. Sattler R., Tymianski M. [Molecularmechanismsofglutamatereceptor-mediatedexcitotoxicneuronalcelldeath.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11831548/)MolNeurobiol. 2001. Vol. 24 (1–3). Р. 107–129.
42. Lai T. W., Zhang S., Wang Y. T. [Excitotoxicityandstroke: identifyingnoveltargetsforneuroprotection.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361499/)ProgNeurobiol. 2014. Vol. 115. Р. 157–188.
43. Нейропротекция и нейропластичность : монография / И. Ф. Беленичев и др. Киев : Логос, 2015. 512 с.
44. S-nitrosylation of C-Src via NMDAR-nNOS module promotes C-Src activation and NR2a phosphorylation in cerebral ischemia/reperfusion / L. J. Tangetal. Mol. Cell. Biochem. 2012. Vol. 365. P. 363–377.
45. Pei J., You X., Fu Q. Inflammationinthepathogenesisofischemicstroke. Front. Biosc. (LandmarkEd). 2015. Vol. 1(20). Р. 772–783.
46. Tso N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)-Induced Apoptosis in Rat Retina / T. Lam Tim etal. Investig.Ophthalmol. Vis. Sc. 1999. Vol. 40. Р. 2391–2397.
47. FisherM., YakovlevA. G., FadenA. I. Mechanismsofneuralcelldeath: implicationsfordevelopmentofneuroprotectivetreatmentstrategies.NeuroRx. 2004. Vol. 1. P. 5–16.
48. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation / A. M. Brennan et al. Nat Neurosci. 2009. Vol. 12. P. 857–863.
49. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and Nox2 / H. Girouard et al. J. Neurosc. 2009. Vol. 29. P. 2545–2552.
50. Шведський В. В., Штриголь С. Ю., Ходаківський О. А. Сучасна церебропротекторна терапія гострих порушень мозкового кровообігу при цукровому діабеті та шляхи її оптимізації. Клін. фарм. 2011. Т.15, № 2. С. 7–12.
51. Галушко О. А., Тріщинська М. А. [Гострий інсульт у жінок: особливості виявлення та корекції вуглеводних порушень](http://www.mif-ua.com/archive/article/48254) [Електрона публікація]//Мед. неотлож. состояний. 2019. № 6 (101). URL: <https://doi.org/10.22141/2224-0586.6.101.2019.179599> (дата звернення: 04.09.2020).
52. Максимова М. Ю., Комелькова Л. В., Охтова Ф. Р. Факторы межклеточного взаимодействия при ишемическом инсульте. Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. 2014. Т. 114, № 2. С. 15–20.
53. Зозуля І. С., Зозуля А. І., Волосовець А. О. Деякі напрямки поліпшення надання медичної допомоги при мозковому інсульті. Укр. вісн. психоневр. 2017. Т. 25, вип. 1. С. 84–85.
54. Зозуля І. С., Зозуля А. І. Лікування хворих на інсульт. Укр. мед. часопис. 2015. № 1. С. 36–39.
55. Міщенко Т. С. Епідеміологія цереброваскулярних захворювань та організація допомоги хворим з мозковим інсультом в Україні. Укр. вісн. психоневр. 2017. Т. 1, № 90. С. 22–24.
56. Мойбенко А. А., Досенко В. Е., Пархоменко А. Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. К. : Наукова думка, 2008. 514 с.
57. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції: методичні рекомендації / Чекман І. С. та ін. К : Держ. експерт. центр МОЗУ, 2016. 93 с.
58. Комплекснаянейроцитопротекция в аспекте фармакодинамики / В. В. Афанасьев и др. Журн. неврол. им. Н. Б. Маньковского. 2017. Т. 5, № 3–4. С. 13–27.
59. Глутаматнаяэксайтотоксичность и окислительныйстресс при экспериментальном тромбозе сосудовсетчатки / А. В. Колесников и др. Нейрохим. 2016. Т. 33, № 2. С. 1–5.
60. Нейропатії: діагностика, диференційна діагностика, лікування / І. С. Зозуля та ін. Укр. мед. часопис. 2019. Т. 2, № 2 (130), С. 1–3.
61. McGeeM. A., Abdel-RahmanA. A. N-Methyl-D-AspartateReceptorSignalingandFunctioninCardiovascularTissues. J .Cardiovasc. Pharmacol. 2016. Vol.68(2). Р. 97–105.
62. Trends in admission blood pressure and stroke outcome in patients with acute stroke and transient ischemic attack in a National Acute Stroke registry / S.Kotonetal. J.Hyperten. 2016. Vol. 34 (2). P. 316–322.
63. Widimský P., Štětkářová I. Neuro-cardiology or cardio-neurology-a new specialization of the future? VnitrniLekarstvi. 2015. Vol. 61 (5). P. 484–486.
64. Власов В. В. Введение в доказательную медицину. М.: МедиаСфера, 2001. 392 с.
65. Гринхальх Т. Основы доказательной медицины:клин.реком. 4-е изд., доп. / под ред. акад. РАН И.Н. Денисова, К.И. Сайткулова, В.П. ЛеоноваМ.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 37 с.
66. Скакун М. П.Основидоказовоїмедицини. Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. 244 с.
67. Уваренко А.Р. Науковаінформація, інноваційнаполітика, доказова медицина –взаємопов’язанікатегоріїуправління у сучасніймедицині. Мед.освіта. 2004. № 1. С. 52.
68. Чубенко А.В., Бабич П.Н., Лапач С.Н. Медицина, основанная на доказательствах, и современные информационные технологии. Укр. мед. часопис. 2004. № 2. С. 49–56.
69. Геморагічний інсульт (внутрішньомозкова гематома, аневризмальний субарахноїдальний крововилив): уніфікований клінічний протокол екстреної, первинної, вторинної/спеціалізованої, третинної/високоспеціалізованої медичної допомоги та медичної реабілітації : Наказ МОЗ України від 17.04.2014 р. № 275. Жур. неврол.ім. Б.М. Маньковського. 2015. Т. 3, № 1. С. 71–90.
70. Стандартизація в нейрохірургії. Ч. 3. Судинні захворювання / за ред. Є. .Г Педаченка. Київ : ДУ ІНХ НАМНУ, 2020. 96 с.
71. A prospective, randomized, single-blinded trial on the effect of early rehabilitation on daily activities and motor function of patients with hemorrhagic stroke / Y. Baietal. J. Clin. Neurosc. 2012. Vol. 19 (10). P. 1376–1379.
72. Accuracy of Prediction Instruments for Diagnosing Large Vessel Occlusion in Individuals with Suspected Stroke: A Systematic Review for the 2018 Guidelines for the Early Management of Patients with Acute Ischemic Stroke / E. E. Smith et al. Stroke. 2018. Vol. 49 (3). P. e111–e122.
73. Нейропротекция при остром инсульте на догоспитальном этапе / В. Б.Афанасьев и др.Мед. неотлож. состояний. 2012. № 5 (44). С. 45–49.
74. Trendsinacuteschemicstroketrialsthroughthe 20th / C. S. Kidwell etal. Stroke. 2001. Vol. 32 (6). Р. 1349–1359.
75. Citicolineforacuteischemicstroke: asystematicreviewandformalmeta-analysisofrandomized, double-blind, andplacebo-controlledtrials / J. J. Secadesetal. J. Stroke Cerebrovas. Dis. 2016. Vol. 25. P. 1984–1996.
76. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial) / A. Dávalos et al. Lancet. 2012. Vol. 380 (9839). Р. 349–357.
77. Cerebrolysin and Recovery After Stroke (CARS): A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Multicenter Trial / D. F. Muresanu et al. Stroke. 2016. Vol. 47 (1). P. 151–159.
78. Guidelinesforthemanagementofspontaneousintracerebralhemorrhage: aguidelineforhealthcareprofessionalsfromtheAmericanHeartAssociation/AmericanStrokeAssociation / J. C. Hemphilletal. Stroke.2015. Vol. 46 (7). P. 2032–2060.
79. Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / C. J. Winstein et al. Stroke. 2016. Vol. 47 (6). P. e98–e169.
80. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association / E. C. Jauch et al. Stroke. 2013. Vol. 44 (3). P. 870–947.
81. Sjakste N., Gutcaits A., KalvinshI.[Mildronate: An Antiischemic Drug for Neurological Indications](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6741751/). CNSDrugRev. 2005. Vol. 11 (2). Р. 151–168.
82. Heuberger J. A. A. C., Cohen A. F. [Reviewof WADA ProhibitedSubstances: LimitedEvidenceforPerformance-EnhancingEffects](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6422964/). SportsMed. 2019. Vol. 49 (4). Р. 525–539.
83. Машковский М. Д. Лекарственныесредства. 16-е изд., перераб. и доп. М : НоваяВолна, 2012. 1216 с.
84. ActionPlanforStrokeinEurope 2018–2030 / B. Norrvingetal. Eur. StrokeJ. Vol. 3 (4). Р. 309–336.
85. TymianskiM. Canmolecularandcellularneuroprotectionbetranslatedintotherapiesforpatients?: yes, butnotthewaywetrieditbefore. Stroke. 2010. Vol. 41(10). Р. 87–90.
86. Stroke unit care benefits patients with intracerebral hemorrhage: systematic review and meta-analysis / P.Langhorne et al. Stroke. 2013. Vol. 44 (11). P. 3044–3049.
87. Meta-analysis of timing of endovascular aneurysm treatment in subarachnoid haemorrhage: inconsistent results of early treatment within 1 day / S. Rawal et al. J. Neurol., Neurosurg. Psych. 2017. Vol. 88 (3). P. 241–248.
88. Яворська В. О., Фломін Ю. В. Специфічне лікування ішемічного інсульту: нейропротекція[Електрона публікація]//Междунар. невролог. журн. 2010. № 6 (36). URL: <http://www.mif-ua.com/archive/article/14305>. (дата звернення: 04.09.2020).
89. Черний В. И. Современнаяконцепцияцеребропротекции: основныеположения и спорныемоменты. Здоров'я Укр. 2008. № 23 (1). С. 7–8.
90. Возможности моделирования ишемии головного мозга у мелких животных / А. Н. Стоянов и др. Междунар. невролог. журн. 2019. № 6 (108). С. 30–36.
91. Цереброваскулярные эффекты блокаторов NMDA-рецепторов и мексидола на фоне аллоксанового сахарного диабета, а также их влияние на течение метаболических процессов в сетчатке монгольских песчанок в острый постперфузионный период / И. Л.Черешнюк и др. Врач-асперант. 2016. № 74(1, 2). С. 295–303.
92. McGraw C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils. Arch. Neurol. 1977. Vol. 34 (6). – Р.334–336.
93. Ходаківський О. А., Волощук Н. І., Жабоєдова Н. В.Підготовка (навчання) на базі навчально-науково-дослідної лабораторії «Фармадар» як складова освітньої підготовки доктора філософії за спеціальністю «222 Медицина».Вісн. Вінницького НМУ”. 2019. Т. 23, № 3. С. 486–489.
94. Кривонос О. В., Амосова Н. А., Смоленцева И. Г. ПрименениеантагонистаглутаматныхNMDA-рецепторов ПК-Мерц в остромпериодеинсульта. Журн. неврол. и психиатр. 2009. № 4. С. 72–74.
95. Карабань И.Н. Применение блокатора глутаматных рецепторов амантадина в неврологии. Междунар. невролог. журн.2012. № 2(48). С. 195–201.
96. Никонов В.В., Савицкая И.Б. Роль антагонистов глутаматных рецепторов (ПК-Мерц) в лечении повреждений мозга: обзор литературы.Мед. неотложныхсостояний2012. № 6. С.5–8.
97. [Mechanismof NMDA receptorchannelblockbyMK-801 andmemantine](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29670280/) /X. Songet al. Nature. 2018. № 556 (7702). Р. 515–519.
98. Соколова Л. І. Довбонос Т. А., Шандюк В. Ю. Застосування сульфату магнію при ішемічному інсульті. Укр. неврологіч. журн. 2015. №4 (37). С.91–97.
99. Prehospitaluseofmagnesiumsulfateasneuroprotectioninacutestroke / J.L. Saveretal. N. Engl. J. Med. 2015. Vol. 372(6). Р. 528–536.
100. [IntravenousMagnesiumSulfateinAcuteStroke](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30852968/) / K. I. Avgerinoset al. Stroke. 2019. Vol. 50 (4). Vol. 931–938.
101. Засіб для лікування порушень пам'яті: пат. 23451, Україна: МКІ А61К31/074 31/535; заявл. 16.06.1994; опубл. 29.12.1999, Бюл. № 8. 6 с.
102. 1-Адамантилетилокси-3-діалкіламіно-2-пропанол гідрохлориди, які виявляють ноотропну дію: пат. 58841 А, Україна, МКІ 7 А61К31/075, 31/535; заявл. 08.11.2002; опубл. 15.08.2003, Бюл. № 8. 3 с.
103. Скринінг актопротекторної дії нових похідних адамантану / О. П. Лонська та ін. Biomed. biosocialanthrop. 2007. № 9. С. 134–137.
104. Скринінг церебропротекторного ефекту серед нових похідних адамантану в умовах експериментальної ішемії головного мозку / О. А. Ходаківський та ін. Фармак. та лікарська токсик. 2010. № 3 (16). С. 8–11.
105. Фармацевтична композиція 1-адамантилетокси-3-діетиламіно-2-пропанол гідрохлорид або його фармацевтично прийнятних солей для створення лікарських засобів для лікування кардіоваскулярної патології: пат. 105475, Україна, МПК (2014.01) С07С 13/615 (2006.01); заявл. 24.12.2013; опубл. 10.04.2013, Бюл. № 9. 4с.
106. Фармацевтична композиція 1-адамантилетокси-3-діетиламіно-2-пропанол гідрохлорид або його фармацевтично прийнятних солей для створення лікарських засобів для лікування цереброваскулярної патології патології: пат. 106032, Україна, МПК (2014.01) С07С 13/615 (2006.01); заявл. 24.12.2013; опубл. 10.07.2014, Бюл. № 13. 4 с.
107. Ходаківський О. А. Вплив адемолу на показники енергетичного обміну в головному мозку щурів із моделлю гострої церебральної ішемії. Буковинський мед. вісн. 2013. Т. 17, № 2. С. 140–143.
108. Ходаківський О. А. Вплив адемолу на стан оксидантно-антиоксидантного балансу в головному мозку щурів із моделлю гострої церебральної ішемії. Питання експеримент. та клін. мед. 2013. Т. 1., вип. 17. С. 123–127.
109. Ходаківський О. А. Вплив курсової експериментальної терапії 4-[оксо-3(4н)-хіназолін] бензойною кислотою (ПК-66) та мексидолом на структурно-функціональні зміни нейронів сомато-сенсорної кори головного мозку при їх ішемічному ураженні. Вісн. Вінницького НМУ. 2008. № 12. С. 279–285.
110. Ходаківський О. А. Вплив курсової експериментальної терапії адемолом (сполукою ЮК-1) на динаміку показників кислотно-лужної рівноваги в ішемізованому головному мозку. Вісн. морф. 2010. Т. 16, № 4. С. 787–790.
111. Ходаківський О. А. Дослідження впливу похідного адамантануадемолу на фрагментацію ДНК ядер нейронів лобних часток кори за ішемії-реперфузії головного мозку у щурів. Укр. вісн. психоневр. 2013. Т. 21, вип. 1. С. 26–28.
112. Ходаківський О. А. Оцінка впливу експериментальної терапії адемолом на інтенсивність перебігу деструктивних змін в мембранах нейронів у монгольських піщанок в умовах гострої церебральної ішемії. Вісн. морфол. 2011. Т. 17, № 1. С. 62–65.
113. Ходаківський О. А. Оцінка впливу похідного адамантану (сполуки ЮК-1) на церебральну гемодинаміку в умовах наркозу та гострої церебральної ішемії. Патол. 2010. Т. 7, № 2. С. 35–37.

117.Ходаковский А. А. Нейроморфологическая оценка эффективности адемола в остром периоде модельного нарушения мозгового кровообращения. Человек и его здоровье. 2013. № 1. С. 32–37.

118.Ходаковский А. А. Церебропротекторные свойства 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанола гидрохлорида (адемола) в восстановительном периоде экспериментального ишемического инсульта. Мед. вест. Юга России. 2013. № 1. С. 80–85.

119.Ходаківський О. А., Павлов С. В., Бухтіярова Н. В. Вплив адемолу на показники обміну NO в щурів із моделлю інфаркту міокарда. [Укр. біохім. журн](http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?Z21ID=&I21DBN=UJRN&P21DBN=UJRN&S21STN=1&S21REF=10&S21FMT=JUU_all&C21COM=S&S21CNR=20&S21P01=0&S21P02=0&S21P03=IJ=&S21COLORTERMS=1&S21STR=%D0%9621341). 2013. Т. 85, № 3. С. 85–89.

120. Аналіз впливу деяких модуляторів активності NMDA рецепторів: мемантину, амантадину або магнію сульфату та адемолу на коливання внутрішньоочного тиску в нормі, за умов гострої модельної офтальмогіпертензії та конзузійної травми зорового аналізатора / В. Л. Повх та ін. Вісник Вінницького НМУ 2016. Т. 20, № 2. С. 352–357.

121. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. / за ред. О. В. Стефанов. К.: Авіцена. 2001. 528 с.

122.Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / подобщ. ред. Р. У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. Москва: Медицина. 2005. 832 с.

123.Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств,ч. 1 / подобщ. ред. А. Н. Миронова.Москва: Гриф и К. 2012. 944 с.

124.Про захисттваринвіджорстокогоповодження: Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV. ВВР. 2006. № 27. ст. 230.

125.EuropeanConventionfortheprotectionofvertebrateanimalsusedforexperimentalandotherscientificpurposes. Strasbourg: CouncilofEuropeEur. TreatySeries. № 123. 11 с.

126.De Simone F., Serratosa J. Biotechnology, animal health and animal welfare within the framework of European Union legislation. Rev. Scientifique Tech. 2005. Vol. 24 1. Р. 89–99.

127.ЯрошО. К., КириченкоС. В., ХалімончикС. П. Методвідтворенняінтрацеребральноїгеморагіїубілихщурів. Кровообіг та гемост. 2005. № 1. С. 77–81.

128.Жабоєдова, Н. В., Ходаківський, О. А. Характеристика моделі геморагічного інсульту на прикладі доклінічної оцінки нейропротекторних властивостей адемолу. Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України: матеріали Х Всеукр. наук.-практ. конфер. з міжнар. уч. (Вінниця, 7–8 листопада 2019 р.). Вінниця: Виготовлювач ТОВ «ТВОРИ», 2019. С.68-70.

129.Жабоєдова Н. В., Загорій Г. В., Ходаківський О. А. Скринінг церебропротекторних властивостей промислового зразка ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемол") на моделях гострого порушення мозкового кровообігу за геморагічним типом. Вісн. морф. 2016. Т. 22, № 1. С. 71–77.

130. Порівняльна оцінка впливу адемолу та німодипіну на церебральну гемодинаміку в корі головного мозку за умов експериментального субарахноїдального крововиливу / О. А. Ходаківський та ін. Світ мед. та біол. 2016. Т. 57, № 3. С.150–153.

131.Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 527 с.

132.Нимодипин и сочетанныенарушениямозгового и коронарного кровообращенияэксперименте / Р. С. Мирзоян и др. Эксперим. и клин. фармак. 2009. Т. 72, № 2. С. 24–28.

133. Експериментальна оцінка впливу нарізного введення мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату на мікроциркуляцію в судинах заднього полюса ока після контузії або в гострий постреперфузійний період на тлі реканалізації а. ophthalmica / В. Л. Повх та ін. Буковинський мед. вісн. 2017. Т. 21, № 1. С. 106–110.

134. Прохорова М. И. Современныеметодыбиохимическихисследований. Л.: Из-во Ленинградскогоун-та, 1982. 272 с

135.Асатиани В.С. Биохимическая фотометрия. М.: Из-во АН СССР, 1957. 836 с.

136.Владимиров Ю.В., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.

137.Заічко Н. В. Окислювальнамодифікаціябiлківсироваткикрові як маркер активностіревматоїдного артриту та їїзмінипідвпливомфармакотерапіїамізоном, індометацином, німесулідом.Вісн.ВінницькогоДМУ. 2003. №7 (2/2). С.664–666.

138.Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцитина.Вопр. мед. хим. 1990. № 2.С.88–91.

139.Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк и др. Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.

140. Власова С. Н., Шабунина Е. И., Перслегина И. А. Активностьглутатион-зависимыхферментовэритроцитов при хроническихзаболеванияхпечени у детей. Лаб. дело. 1990. № 8. С. 19–22.

141. Гула Н. М. Косякова Г. В., Бердишев А. Г. Вплив N-стеароїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом. Укр. біохім. журн. 2007. Т. 79, № 5. С. 153–158.

142. Попова Л. Д. Вплив триптофану на вміст нейромедіаторів в головному мозку щурів із різним рівнем судомної готовності. Мед. хім. 2007. № 1. С.82–85.

143.Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшаяшкола, 1980. 272 с.

144.Portier B. P. Ferrari D. C., Taglialatela G. Rapidassayforquantitativemeasurementofapoptosisinculturedcellsandbraintissue. J. Neurosc. Methods. 2006. Vol. 15, 155 (1). P. 134–142.

145. Багаурі О. В., Ходаківський О. А. Характеристика морфологічних змін сомато-сенсорної кори головного мозку щурів на тлі експериментальної терапії модельного інсульту похідним 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу (сполука R-86) та цитиколіном. Укр. мед. альм. 2013. Т. 16, № 5. С. 3–8.

146.Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшаяшкола. 1990. 352 с.

147.Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистика в науке и бизнесе: практическое руководство. К.: Морион, 2002. 640 с.

148.Буднюк О. О., Карташов О. А., Артеменко В. Ю. Нейрон-специфічна енолаза як маркер пошкодження головного мозку та ефективності нейропротекторної терапії при гострій церебральній недостатності. Новости мед. и фарм. 2016. № 4 (579). С. 8–10.

149. Use of neuron-specific enolase to predict mild brain injury in motorcycle crash patients with maxillofacial fractures: а pilot study / M.Ruslinetal. Chin. J. Traumatol. 2019. Vol. 22(1). Р. 47–50.

150.Prognostic value of somatosensory evoked potentials, neuronspecific enolase, and S100 for short-term outcome in ischemic stroke / W. F. Haupt et al.J. Neurophys. 2016. – Vol. 115 (3). P. 1273–1278.

151. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Дослідження неврологічного дефіциту у щурів із геморагічним інсультом на тлі терапії адемолом та оцінка його мнемотропної активності. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : матеріали І наук.-практ. інтернет-конфер. з міжнар. уч. (18 жовтня 2018). Х. : НФаУ, 2018. С. 90–91.

152. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Дослідження метаболічних процесів у головному мозку за умов геморагічного інсульту на тлі фармакотерапії адемолом. Вісн. Вінницького НМУ. 2019. № 3 (23). С. 360–367.

153. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Оцінка імуноферментрних та протоково-цитометричних маркерів церебропротекторної дії адемолу в умовах експериментального геморагічного інсульту за активністю процесів нейроцитолізу, нейроапоптозу та нейропроліферації. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція: тези доп. ІІ наук.-практ. інтернет-конфер. з між нар. уч. (Харків, 21 листопада 2019 р.). Х.: НФаУ, 2019. С. 153–154.

154.Галица В. В. Беленичев И. Ф., Коваленко С. И. Нейропротективныеэффектыбензиловогоэфира 2-(3,4-дигидро-3-оксо-2Н-[1,2,4]-триазино[4,3-с] хиназолин-4-ил)уксуснойкислоты (ко-17) в условияхмоделированиявнутримозговогокровоизлияния. Нейронауки: теорет. та клін. аспекти. 2008. № 2. С. 74–77.

155.[Animal StrokeModel: Ischemia-Reperfusion andIntracerebralHemorrhage/ C. Ren](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27604729/) et al. Meth. Mol. Biol. 2016. Vol. 1462. Р. 373–390.

156.Comparison of Different Preclinical Models of Intracerebral Hemorrhage / A.[Manaenko](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Manaenko%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21725724) et al. Acta Neurochir. Suppl. 2011.Vol. 111. Р. 9–14.

157.Rapidblood-pressureloweringinpatientswithacuteintracerebralhemorrhage / C. S. Andersonetal. New Eng. J. of Med. 2013. Vol. 368 (25). P. 2355–2365.

158.Intensive blood-pressure lowering in patients with acute cerebral hemorrhage / A. I. Qureshi et al. New Eng. J. of Med. 2016. Vol. 375. P. 1033–1043.

159.Intensive blood pressure reduction and spot sign in intracerebral hemorrhage: a secondary analysis of a randomized clinical trial / A.Morotti et al.JAMA Neurol. 2017. Vol. 74 (8). P.950–960.

160.Serum neuron-specific enolase levels in preterm and term newborns and in infants 1–3 months of age / A. Abbasoglu et al. Pediatr.Neonatol. 2015. Vol. 56 (2). P. 114–119.

161.Proinflammatory cytokines, enolase and S-100 as early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy following perinatal asphyxia in newborns / V. Chaparro-Huerta et al. Pediatr.Neonatol. 2017. Vol. 58 (1). P. 70–76.

162.MattsonM. R. Calciumandneurodegeneration. Aging. Cell. 2007. Vol. 6 (3). P. 337–350.

163.The Role of Platelet Activation and Inflammation in Early Brain Injury following subarachnoid hemorrhage / J. A. [Frontera](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Frontera+JA&cauthor_id=27430874)et al. Neurocrit. Care. 2017. Vol. 26(1). Р. 48–57.

164.Systemic inflammatory response syndrome as predictor of poor outcome in nontraumatic subarachnoid hemorrhage patients / V. Rass et al. Crit. Care Med. 2018. Vol. 46(12). Р. e1152–e1159.

165.Early brain injury associated with systemic inflammation after subarachnoid hemorrhage / J.Savarraj et al. Neurocrit. Care. 2018. Vol. 28(2). Р. 203–211.

166.Clinical use of cerebral microdialysis in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage-state of the art / R.Helbok et al. Front Neurol. 2017. Vol. 8. Р. 565.

167.[Rass](https://www.researchgate.net/profile/Verena_Rass2)V., [Helbok](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/38357396_Raimund_Helbok) R. Early Brain Injury After Poor-Grade Subarachnoid Hemorrhage[Current Neurology and Neuroscience. Reports.2019.](https://www.researchgate.net/journal/1528-4042_Current_Neurology_and_Neuroscience_Reports) Vol. 19(10). Р. 6–9.

168 .WeimerJ. M., JonesS. E., FronteraJ. A. Acute cytotoxic and vasogenic edema after subarachnoid hemorrhage: a quantitative MRI study. AJNR. Am. J.Neuroradiol. 2017. Vol. 38(5). Р. 928–934.

169.Acute ischaemia after subarachnoid haemorrhage, relationship with early brain injury and impact on outcome: a prospective quantitative MRI study / J. A. Fronteraet al. J.Neur.Neurosurg.Psychiat. 2015. Vol.86(1). Р. 71–78.

170.Mechanisms of global cerebral edema formation in aneurysmal subarachnoid hemorrhage / E. G.Hayman et al. Neurocrit Care. 2017. Vol.26(2). Р. 301–310.

171. Пасічник Г. П., Мартинчук Ю. Н., Орел В. М. Нейропротекція після системного тромболізису в пацієнтів з ішемічним інсультом: огляд клінічних випадків. Междунар. невролог. журн. 2019. № 6 (108). С. 37–41.

172.Бурчинский С.Г. Нейрометаболическая фармакотерапия при хронических нарушениях мозгового кровообращения.Междунар. невролог. журн. 2019. № 6 (108). С. 46–51.

173.Бурчинський С.Г. Нейропротекція при гостромуішемічномуінсульті: віднейрофармакології до фармакотерапії.Междунар. невролог. журн. 2019. № 6 (108). С. 59–63.

174.Preventing cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage with aggressive cisternal clot removal and nicardipine / N. Ota et al. World Neurosurg. 2017. Vol. 107. Р. 630–640.

175.Ходаківський О. А., Степанюк Г. І. Оцінка фармакотерапевтичної ефективності двох похідних адамантану (сполук ЮК-1 та ЮК-4) за динамікою показника летальності на моделі гострого порушення мозкового кровообігу у монгольських піщанок. Вісн. Вінницького НМУ. 2011. Т. 15, № 1. С. 47–50.

176. Жабоєдова Н. В. Характеристика показників центральної гемодинаміки, внутрішньочерепного тиску та мікроциркуляції в капілярах кори головного мозку у щурів із різними підтипами геморагічного інсульту та тлі інфузії розчинів Адемолу або німодиіну. Biomed. вiosoc. anthropol. 2016. Vol. 27. Р. 62–67.

177.Effectsofpreadmissionbeta-blockersonneurogenicstunnedmyocardiumafteraneurysmalsubarachnoidhemorrhage: а meta- analysis /[H. Luo](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Luo+H&cauthor_id=28499220)et al.Clin. Neurol. Neurosurg. 2017. Vol. 158. Р. 77–81.

178.Beta-blockertherapyisnotassociatedwithmortalityafterintracerebralhemorrhage / M. [Sykora](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Sykora+M&cauthor_id=28869294)et al.ActaNeurol. Scand. 2018. Vol. 137 (1). Р. 105–108.

179.Pre admission treatment with Beta-blockers in hypertensive patients with acute stroke and 3-month outcome-Data from a national stroke registry / Y.J [Eizenberg](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Eizenberg+Y&cauthor_id=29520943) et al.Clin.Hypertens (Greenwich).2018.Vol. 20(3). Р. 568–572.

180.Beta-blocker therapy and impact on outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a cohort study / N.[Chalouhi](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Chalouhi+N&cauthor_id=26799296) J.Neurosurg.2016.Vol. 125(3). Р. 730–736.

181.Beta-Blockade in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: a Systematic Review and Meta-Analysis / A. V. Ramesh et al.Neurocrit. Care. URL: 10.1007/s12028-020-00915-5. (дата звернення 05.09.2020).

182.The adrenergic receptor antagonist carvedilol interacts with serotonin 2A receptors both in vitro and in vivo / K. S. Murnaneetal. Pharmacol.Biochem.Behavior. URL: 10.1016/j.pbb.2019.04.003. (дата звернення 05.09.2020).

183.Белобородова Н.В. Дмитриева И.Б., Черневская Е.А. Диагностическая значимость белка S100B при критических состояниях. Общ.реанимат. 2011. T. 7, № 6. C. 72–76.

184.Прогностическое значение белка S100, нейронспецифическойэнолазы, эндотелина-1 в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы / Н. Н.Епифанцева и др. Мед. неотложных состояний. 2013. №3 (50). С. 85–90.

185. Оцінка ефективності експериментальної терапії геморагічного інсульту промисловим зразком ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемол") за активністю маркера нейродеструкції нейрон-специфічної енолази / Н. В. Жабоєдова и др. Фармація XXI століття: тенденції та перспективи: матеріали VІІІ Нац. з’їзду фармацевтів України (м. Харків, 13–16 вересня 2016 р.): у 2 т. Т. 2 // МОЗУ, Нац. Фармац. ун-т; ред. кол.: В. П. Черних (голова) та ін.; уклад.: С. Ю. Данильченко та ін. Харків; НФаУ, 2016. С. 120-121.

186. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка церебропротекторної дії промислового зразка ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемол"), амантадину та магнію сульфату при субарахноїдальному крововиливі у щурів за активністю нейрон-специфічної енолази. Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології: тези доп. Всеукр. наук.-практ. конфер. з з між нар. уч., пам’яті проф. В. В. Дунаєва (Запоріжжя, 24–25 листопада 2016 р.). Запоріжжя: Запоріжський ДМУ, 2016. С. 43.

187. Застосування комплексного патогенетично-обґрунтованого підходу до вивчення ефективності потенційних цитопротекторів при ішеміко-гіпоксичному, токсичному або травматичному ураженні серця, печінки, нирок, органа зору, центральної та периферичної нервової системи (нерви щелепно-лицьової ділянки, тощо) / Ходаківський О. А. та ін. Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України : матеріали ІХ Всеукр. наук.-практ. конфер. з міжнар. уч. (Вінниця, 16–17 листопада 2017 р.). Вінниця: Нілан-ЛТД, 2017. С.269-273.

188. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Оцінка імуноферментрних та протоково-цитометричних маркерів церебропротекторної дії адемолувумовах експериментального геморагічного інсульту за активністю процесів нейроцитолізу, нейроапоптозу та нейропроліферації. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : матеріали ІІ наук.-практ. інтернет-конфер. з між нар. уч. (Харків, 21 листопада 2019). Харків: НФаУ, 2019. С. 153–154.

189.Рациональнаянейропротекция : монография / И. Ф. Беленичев и др. Донецк: Изд. домЗаславский, 2009. 262 с.

190.WaringP., Kos F. J., Mullbacher A. Apoptosisorprogrammedcelldeath. Med. Res. Rev. 2008. № 11. Р. 219–236.

191.Zinc deficiency mediates alcohol-induced apoptotic cell death in the liver of rats through activating ER and mitochondrial cell death pathways / Q. Sunetal. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2015. Vol. 308(9). Р. 757–766.

192.Themolecularandultrastructuralaspectsoftheformationofmitochondrialdysfunctioninthemodelingofchroniccerebralischemia: themitoprotectiveeffectsofangiolin / I. F. Belenichevetal. Neurochem. J. 2016. Vol. 10 (2). P. 131–136.

193. Вплив діакамфу гідрохлориду на інтенсивність нейроапоптозу при експериментальному порушенні мозкового кровообігу на тлі цукрового діабету / В. В. Шведський и др. Фармак. лік.токсикол. 2012. № 2. С. 49–53.

194.KnightR. A., MelinoG. Celldeathindisease: from 2010 onwards. CellDeathDis. 2011. Vol. 2. Р. 202.

195.Role of Apoptosis in disease / B. Favaloro et al.Aging. 2012. № 5, Vol. 4. Р. 330–349.

196. Voloshchuk N., Zhaboiedova N. Evaluation of the cerebroprotective action of 1-adamantyloxy-3morpholino-2-propanol hydrochloride in rats with experimental hemorrhagic stroke according to the dynamics of neurocytolysis, neuroapoptosis and neuroproliferation markers. Biological Marker. 2020. Vol. 4, № 2. P. 13–19.

197. ЖабоєдоваН. В. Оцінка церебропротекторної активності адемолу в умовах геморагічного інсульту у щурів. Перший крок в науку – 2020: тези доповідей XVII наук.-практ. конфер. студентів та молодих вчених з міжнар. уч. (Вінниця, 8–10 квітня 2020 р.). Вінниця: Видавник ФОП Корзун Д.Ю.,2019. С.487.

# ДОДАТКИ

# *ДОДАТОК 1*

**СПИСОКПУБЛІКАЦІЙПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Жабоєдова Н. В., Загорій Г. В., Ходаківський О. А. Скринінг церебропротекторних властивостей промислового зразка ампульного розчину 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду («Адемол») на моделях гострого порушення мозкового кровотоку за геморагічним типом // Вісник морфології. 2016. Т. 22, № 1. С. 83–87.
2. Ходаківський О. А., Жабоєдова Н. В., Рокунець І. Л., Загорій Г. В. Порівняльна оцінка впливу адемолу та німодипіну на церебральну гемодинаміку в корі головного мозку за умов експериментального субарахноїдального крововиливу // Світ медицини та біології. 2016. № 3(57) С. 150–153.
3. Жабоєдова Н. В. Характеристика показників центральної гемодинаміки, внутрішньочерепного тиску та мікроциркуляції в капілярах кори головного мозку у щурів із різними підтипами геморагічного інсульту та тлі інфузії розчинів Адемолу або німодиіну // Biomedicalandbiosocialanthropology. 2016. № 27. С. 62–67.
4. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Дослідження метаболічних процесів у головному мозку за умов геморагічного інсульту на тлі фармакотерапії адемолом // Вісник Вінницького Національного медичного університету імені М. І. Пирогова. 2019. №3(23). С. 360–367.
5. Voloshchuk N., Zhaboiedova N. Evaluationofthecerebroprotectiveactionof 1-adamantyloxy-3morpholino-2-propanol hydrochlorideinratswithexperimentalhemorrhagicstrokeaccording to thedynamicsofneurocytolysis, neuroapoptosisandneuroproliferationmarkers. BiologicalMarker. 2020. Vol. 4, № 2. P. 13–19.

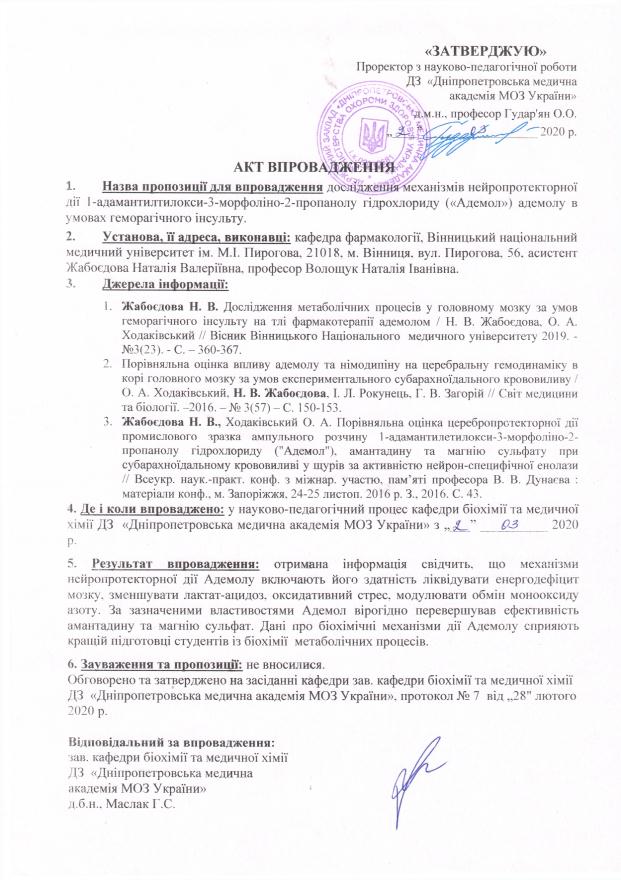
***ДОДАТОК 2***

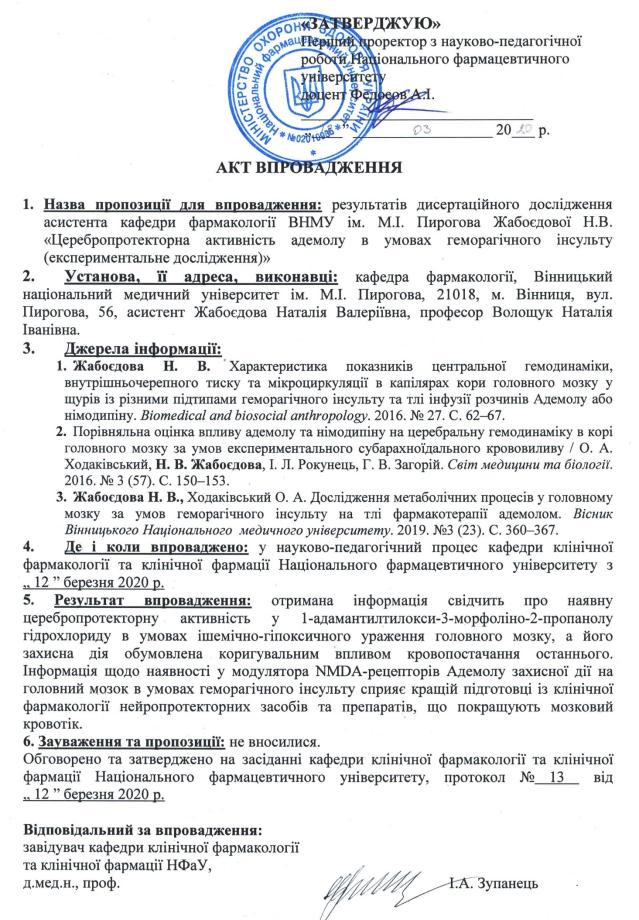
**АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

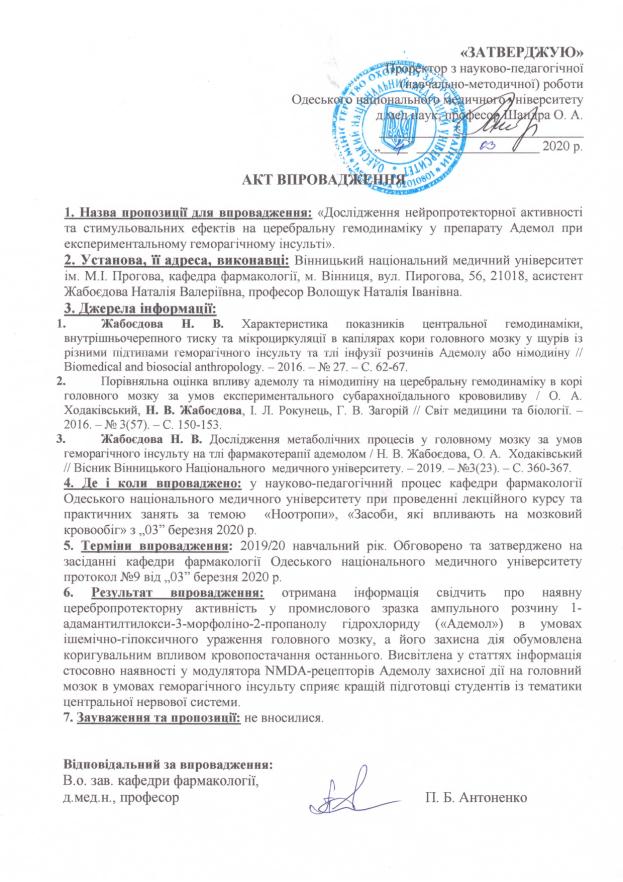
1. Оцінка ефективності експериментальної терапії геморагічного інсульту промисловим зразком ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемол") за активністю маркера нейродеструкції нейрон-специфічної енолази / Н. В. Жабоєдова и др. Фармація XXI століття: тенденції та перспективи : матеріали VІІІ Національного з’їзду фармацевтів України (м. Харків, 13–16 вересня 2016 р.): у 2 т. Т. 2 // Міністерство охорони здоров'я України, Національнийфармацевтичний університет; ред. кол.: В. П. Черних (голова) та ін.; уклад.: С. Ю. Данильченко та ін. Харків; НФаУ, 2016. С. 120–121.
2. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка церебропротекторної дії промислового зразка ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемол"), амантадину та магнію сульфату при субарахноїдальному крововиливі у щурів за активністю нейрон-специфічної енолази. Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології : тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, пам’яті проф. В. В. Дунаєва (Запоріжжя, 24–25 листопада 2016 р.).Запоріжжя : Запоріжський ДМУ, 2016. С. 43.
3. Застосування комплексного патогенетично-обґрунтованого підходу до вивчення ефективності потенційних цитопротекторів при ішеміко-гіпоксичному, токсичному або травматичному ураженні серця, печінки, нирок, органа зору, центральної та периферичної нервової системи (нерви щелепно-лицьової ділянки, тощо) / Ходаківський О. А. та ін. Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України : матеріали ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (Вінниця, 16–17 листопада 2017 р.). Вінниця : Нілан-ЛТД, 2017. С. 269–273.
4. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Дослідження неврологічного дефіциту у щурів із геморагічним інсультом на тлі терапії адемолом та оцінка його мнемотропної активності. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : матеріали І науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю(18 жовтня 2018 р.). Х. : НФаУ, 2018.С. 90–91.
5. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Оцінка імуноферментрних та протоково-цитометричних маркерів церебропротекторної дії адемолу в умовах експериментального геморагічного інсульту за активністю процесів нейроцитолізу, нейроапоптозу та нейропроліферації. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : тези доповідей ІІ науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю (Харків, 21 листопада 2019 р.). Х. : НФаУ, 2019. С. 153–154.
6. Жабоєдова Н. В., Ходаківський О. А. Характеристика моделі геморагічного інсульту на прикладі доклінічної оцінки нейропротекторних властивостей адемолу. Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України : матеріали Х Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (Вінниця, 7–8 листопада 2019 р.). Вінниця: ТОВ «ТВОРИ», 2019.С. 68–70.
7. Жабоєдова Н. В. Оцінка церебропротекторної активності адемолу в умовах геморагічного інсульту у щурів. Перший крок в науку – 2020 : тези доповідей XVII науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю (Вінниця, 8–10 квітня 2020 р.). Вінниця : ФОП Корзун Д.Ю., 2019. С. 487.

***ДОДАТОК 3***

**АКТИ ВПРОВАДЖЕНЬ**











***ДОДАТОК 4***

