

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ

Т. В. Повышева<sup>1</sup>, В. Э. Семенов<sup>2</sup>, И. В. Галяметдинова<sup>2</sup>, В. С. Резник<sup>2</sup>,  
К. С. Кнни<sup>1</sup>, П. Е. Колесников<sup>1</sup>, С. В. Кузнецова<sup>3</sup>, Ю. А. Челышев<sup>1</sup>

На модели дозированной контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне Th8 исследовано влияние системного действия отечественного препарата ксимедона и его новых производных — L-аскорбата и *para*-аминобензоата 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-оксиэтил)пиримидона-2 (соединения 29Д и 34Д, соответственно) на восстановление двигательной функции, сохранность ткани спинного мозга, численность популяции и фенотипические характеристики астроцитов в зонах серого и белого вещества. Ксимедон оказывает стимулирующее влияние на восстановление двигательной функции. По этому критерию соединения 29Д и 34Д являются более эффективными, чем ксимедон. Каждое из 3 исследованных производных пиримидина существенно уменьшает суммарную площадь патологических полостей в спинном мозге. По этому показателю соединения 29Д и 34Д оказываются более эффективными, чем ксимедон. При этом установлено, что соединение 29Д обладает более выраженным действием в зоне вхождения дорсальных корешков (DREZ), а соединение 34Д в большей мере поддерживает сохранность ткани в передних рогах (VH). К 60 сут эксперимента в большинстве исследованных зон серого вещества количество GFAP<sup>+</sup>-астроцитов при введении соединений 29Д и 34Д уменьшается, по сравнению с ксимедоном, параллельно с уменьшением экспрессии в ткани этого маркерного белка промежуточных филаментов. В белом веществе количество GFAP<sup>+</sup>-клеток под влиянием соединения 29Д увеличивается, а под влиянием соединения 34Д — уменьшается. Различия в действии соединений 29Д и 34Д на фоне сходного по эффективности влияния на восстановление двигательной функции могут свидетельствовать о различных клеточных и молекулярных механизмах действия, и в этом смысле согласуются с результатами сравнения эффектов этих соединений на сохранность ткани.

**Ключевые слова:** травма спинного мозга; пиримидин; ксимедон; нейрогенерация; крысы.

### ВВЕДЕНИЕ

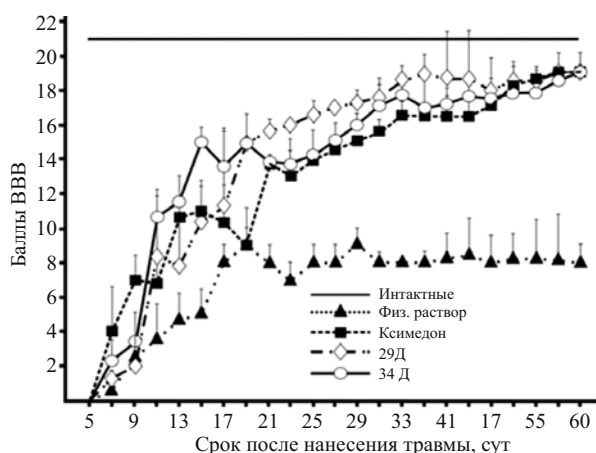
Патологические сдвиги при травме спинного мозга многочисленны и включают проявления вторичного повреждения — воспалительный ответ, ишемию, гипоксию, окислительный стресс, эксайтотоксичность, развитие болевого синдрома. Все они приводят к гибели нейрональных клеток, к демиелинизации и деструкции нервных волокон. Эти негативные сдвиги вместе с формированием глиального барьера, препятствующего росту аксонов, вызывают нарушение нервных связей и устойчивый функциональный нейродефицит. Многочисленные доклинические ис-

следования и клинические испытания направлены на разработку лекарственных средств для преодоления последствий травмы спинного мозга [5, 7, 10]. В последнее десятилетие для ее лечения особое внимание было уделено соединениям и лекарственным средствам (АТГ-355, cethrin, глибенкламид, сульфат магния, миноциклин, нимодипин, оксидит, премарин, рилузол), которые зарекомендовали себя как наиболее эффективные для преодоления последствий травмы спинного мозга, а их большая часть предлагается для дальнейших углубленных исследований. Большинство этих средств сдерживает гибель нейронов благодаря прямому на них влиянию. Для ослабления посттравматической нейродегенерации и преодоления ее последствий достаточно перспективным представляется поиск соединений, которые оказывают нейропротекторное действие не только прямым влиянием на нейроны, но и способны опосредованно поддерживать их выживание, обладая противовоспалительным, антиоксидантным, цитопротекторным (в отношении глиальных клеток) и противоболевым действием. Этому условию в

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Россия, 420012, Казань, ул. Бултерова, 49.

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова» Казанского научного центра РАН, Россия, 420088, Казань, ул. Арбузова, 8.

<sup>3</sup> Междисциплинарный центр аналитической микроскопии ФГОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, 420011, Казань, ул. Кремлевская, 18.



**Рис. 1.** Динамика восстановления двигательной функции по результатам теста ВВВ. По оси абсцисс — сутки после нанесения травмы, по оси ординат — показатель теста в баллах. Сплошная линия — показатель теста у интактных животных.

полной мере удовлетворяют производные пиримидина, для которых установлено, что они не только являются универсальными стимуляторами регенерации различных тканей, но и обладают выраженным нейротропным действием, поддерживая регенерацию периферических нервных структур [2, 3]. Ранее нами показана перспективность одного из производных пиримидина, а именно лекарственного средства ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-N-(2-оксиэтил)пиримидона-2), который стимулирует посттравматическую регенерацию миелиновых волокон в периферическом нерве и поддерживает выживание нейронов [2, 3, 8]. Возможное стимулирующее влияние производных пиримидина на регенерацию в ЦНС изучено недостаточно. Применительно к нейрорегенерации не проведено сопоставление эффективности производных пиримидина и других фармакологических препаратов, обладающих сходным действием.

Первой задачей данного исследования явилось выявление возможного влияния ксимедона на преодоление последствий нейрорегенерации на модели дозированной контузионной травмы спинного мозга (КТСМ) крысы.

В лаборатории химии нуклеотидных оснований Института органической и физической химии им. А. Е. Арбузова Казанского научного центра РАН синтезирован ряд новых производных ксимедона, из которых в ходе предварительного скрининга по критериям восстановления двигательной функции выделены 2 наиболее эффективно действующих соединения 29Д и 34Д, представляющих собой L-аскорбат и *пара*-аминобензоат 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-оксиэтил)пиримидона-2, соответственно. Поэтому второй задачей работы явилось сопоставление на той же экспериментальной модели эффективности действия ксимедона и его новых аналогов на восстановление двигательной функции животных и численность популяции астроцитов в ткани спинного мозга.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

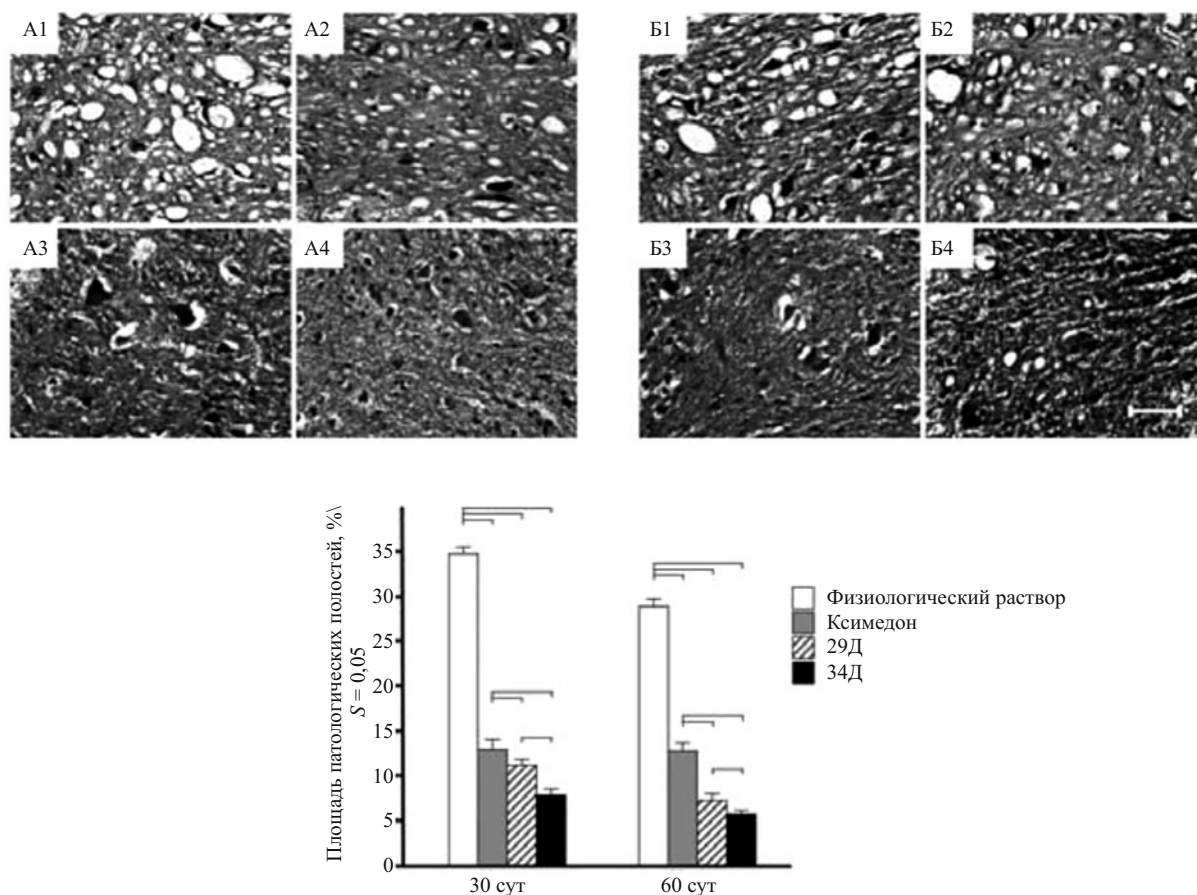
Эксперименты проведены на 50 белых лабораторных крысах-самках массой 200–250 г (питомник г. Пущино). Содержание и использование лабораторных животных соответствовало международным нормам и правилам, принятым и одобренным локальным этическим комитетом в Казанском государственном медицинском университете (протокол № 8 от 20 октября 2015 г.). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Всем животным, наркотизированным хлоралгидратом (Sigma, США) (80 мг/мл, 0,4 мл внутривенно), осуществляли КТСМ на уровне Т8 с помощью вертикально падающего строго на центр визуализируемого участка спинного мозга металлического стержня весом 10 г и диаметром 2 мм с высоты 25 мм (weight-drop — метод) [1].

После травмы животным опытных групп внутривенно вводили 30 % раствор ксимедона, соединения 29Д или соединения 34Д в дозе по 30 мг/кг в стерильной дистиллированной воде. Введение производных пиримидина проводили ежедневно в одно и то же время в течение 30 сут. Контрольную группу составили крысы с КТСМ и введением физиологического раствора в тех же условиях. В течение 7 сут после операции всем животным внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) 1 раз в сутки.

Для оценки двигательной функции использовали поведенческий тест ВВВ и тест удержания на вращающейся оси (Ротарод) для оценки координации и утомляемости [1]. Ежедневно в течение 3 сут, предшествующих операции, животных тренировали в открытом поле и на аппарате Rotarod (Tredmill7700,  $d = 8$  см,  $r = 12$  об/мин). На 7 сут после КТСМ крыс исследовали через день на протяжении 2 мес в одно и то же время, регистрируя параметры произвольных движений в баллах и время удержания на вращающейся оси в секундах.

Для проведения иммуногистохимических реакций и оценки патологических полостей на 30 и 60 сут после нанесения травмы животных наркотизировали и транкардиально перфузировали 4 % раствором параформальдегида (4 °С). Фрагмент спинного мозга забирали вместе с позвонками. Через 24 ч от начала фиксации выделяли спинной мозг и помещали в 30 % раствор сахарозы. Для иммуногистохимического исследования использовали фрагмент мозга длиной 10 мм в каудальном направлении от эпикастра травмы. Для морфометрии полостей ткани спинного мозга изучали область приложения травмирующей силы.

Материал обезжизивали и заливали в парафин по стандартной методике. Поперечные срезы толщиной 10 мкм окрашивали метиленовым синим. Патологические полости морфометрировали на каждом пятом поперечном срезе площадью 0,05 мм<sup>2</sup> в зоне вхождения дорсальных корешков (DREZ), в вентральных рогах



**Рис. 2.** Деструктивные изменения серого вещества в вентральных рогах (VH) спинного мозга крысы в эпицентре травмы на 30 (A1 – A4) и 60 сут (B1 – B4) эксперимента: A1 и B1 — физиологический раствор, A2 и B2 — ксимедон, A3 и B3 – 29Д, A4 и B4 – 34Д. Полутонкие срезы, окраска метиленовым синим. Увеличение  $\times 40$ . В — суммарная площадь патологических полостей. По оси абсцисс — зона морфометрии; по оси ординат — исследованный параметр (%). Вертикальные квадратные скобки —  $p < 0,05$ .

(VH), вентральных канатиках (VF) и латеральных канатиках (LF) на обеих сторонах. Отношение суммарной площади полостей в пикселях соотносилось с общим количеством пикселей в оцифрованном изображении данной зоны и выражалось в процентах.

Для флуоресцентной иммуногистохимии поперечные срезы спинного мозга толщиной 20 мкм, изготовленные на криостате Microm HM 560 (ThermoScientific), инкубировали с антителами против белков GFAP (Santa Cruz Biotechnology, США) в разведении 1:200, против S100B – 1:1200 (Sigma, США) и против AQP4 – 1:150 (Santa Cruz Biotechnology, США) при температуре 4 °C в течение 24 ч. После промывания в PBS с добавлением 0,05 % Triton X-100 срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 555 (Invitrogen, США), Alexa 647 (Invitrogen, США) и Alexa 488 (Invitrogen, США) в разведении 1:200. Ядра клеток дополнительно окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Sigma, США). Срезы просматривали в конфокальном сканирующем микроскопе LSM 510-Meta (Carl Zeiss, Германия).

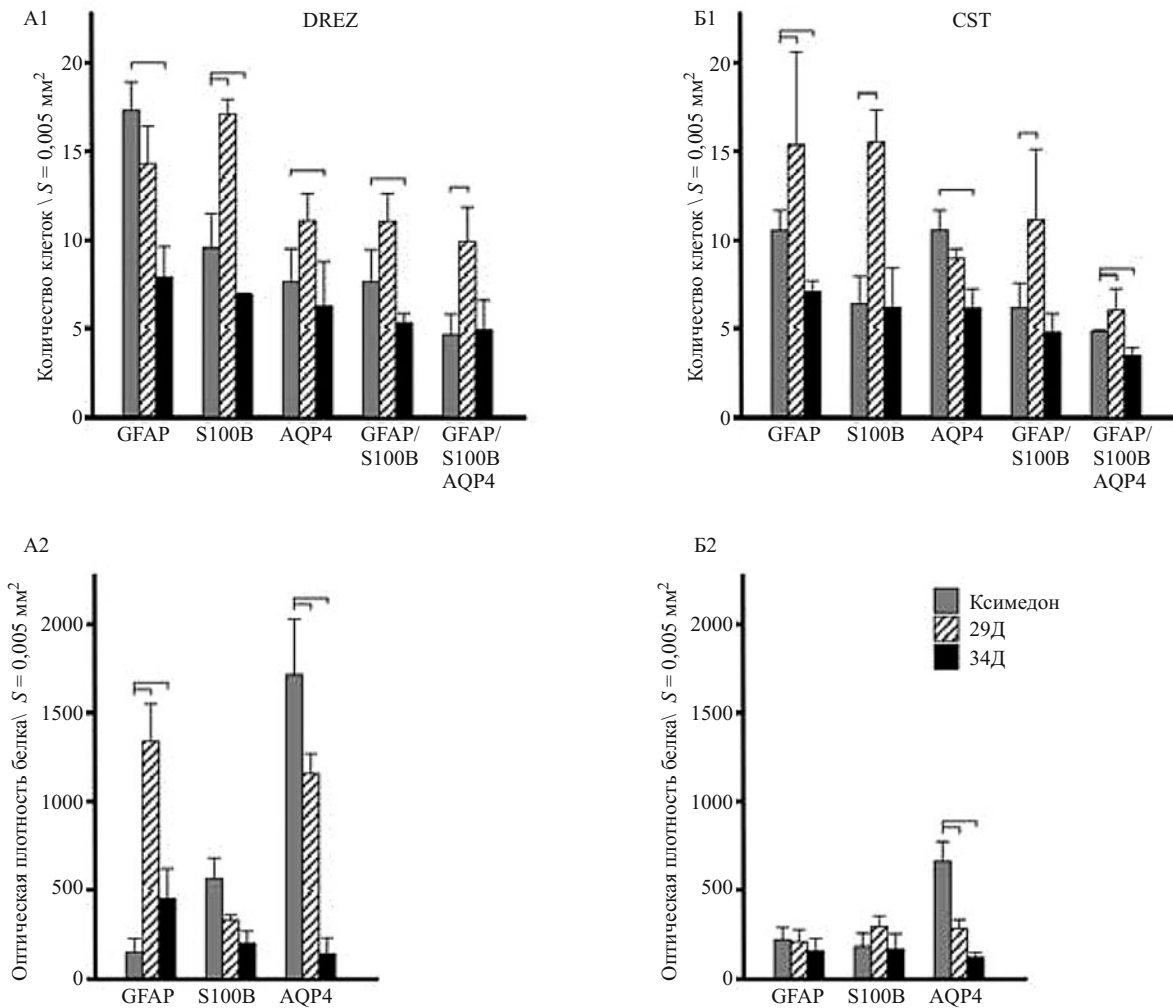
Подсчитывали иммунопозитивные клетки в области площадью 0,05 мм<sup>2</sup> в следующих зонах белого ве-

щества: кортикоспинальный тракт в дорсальных канатиках (CST) и VF; серого вещества — VH и DREZ и центральный канал (CC). Количество клеток в VF, VH и DREZ подсчитывали на обеих сторонах.

Цифровые изображения срезов спинного мозга анализировали с помощью программы ImageJ 1.47j (<http://imagej.nih.gov/ij>). При подсчете количества клеток принадлежность иммунопозитивных структур конкретной клетке определяли по локализации ее ядра, выявляемого при помощи DAPI.

В качестве показателя уровня экспрессии белков в клетках использовали абсолютную величину оптической плотности соответствующих маркеров на цифровом изображении среза. Изображения получали при стандартизированных значениях пинхола, мощности лазеров и скорости сканирования.

Результаты расчетов статистически обрабатывали в программе Origin 8.1 Pro с использованием дисперсионного анализа ANOVA. Для всех данных уровень достоверности был принят меньше 0,05 ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.** Количество GFAP<sup>+</sup>, S100B<sup>+</sup>, AQP4<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup>/S100B<sup>+</sup> и GFAP<sup>+</sup>/S100B<sup>+</sup>/AQP4<sup>+</sup> клеток и оптическая плотность флуоресценции белков GFAP, S100B и AQP4 в зоне вхождения дорсальных корешков (DREZ) (A1 и A2) и в кортикоспинальном тракте (CST) (B1 и B2) на расстоянии 5 мм каудальнее эпикампара травмы к 60 сут после нанесения травмы крысам и введения производных пиримидина в течение первых 30 сут.

Вертикальные квадратные скобки —  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Тест ВВВ.** До 6 сут после травмы двигательная активность задних конечностей у травмированных животных всех групп практически отсутствует (рис. 1). В период 6 – 10 сут наблюдается вялый паралич задних конечностей с постепенным появлением слабых движений. В группе животных с ксимедоном в этом временном интервале отмечено более динамичное нарастание показателя теста, по сравнению с животными групп с физиологическим раствором, 29Д и 34Д. Так, на 9 сут показатель теста у крыс в группе с ксимедоном превышает показатели в группах 29Д и 34Д, соответственно, на 71,4 и 50,9 % ( $p < 0,05$ ). В течение второй недели после нанесения травмы наблюдается наиболее динамичная картина восстановления двигательной функции у животных с введением производных пиримидина, по сравнению с группой с введением физиологического раствора. К концу третьей недели у

животных в группе с физиологическим раствором снижается показатель теста с последующим выходом на плато, а у животных с введением производных пиримидина двигательная функция продолжает улучшаться.

Среднее значение показателя теста по результатам наблюдений в течение первых 2 мес после нанесения травмы имело достоверно большее значение в группе 34Д (в 2,40 раза) и 29Д (в 2,37 раза), по сравнению с группой с физиологическим раствором ( $p < 0,05$ ).

**Тест Ротарод.** На 14 сут после нанесения травмы у животных всех экспериментальных групп наблюдается улучшение показателя теста, по сравнению с группой животных с введением физиологического раствора (таблица). В период 2 – 4 недели показатель теста увеличивается в 8 – 10 раз у животных с введением производных пиримидина, по сравнению с группой с физиологическим раствором. По сравнению с животными из группы ксимедона значительное улучшение

показателя теста в группе 29Д начинает проявляться с 30 сут. К 60 сут показатель теста в группах с введением новых аналогов ксимедона увеличивается в 5,5 и 1,7 раза по сравнению с группами с физиологическим раствором и ксимедоном, соответственно ( $p < 0,05$ ).

**Сохранность ткани спинного мозга.** После нанесения КТСМ на 30 сут (рис. 2, А1 – А4) и 60 сут (рис. 2, Б1 – Б4) в относительно сохранном сером и белом веществе выявлены признаки деструкции ткани в виде многочисленных полостей различной величины. Подсчет их суммарной площади на поперечных срезах спинного мозга выявил во всех исследованных зонах морфометрии в сером и белом веществе уменьшение значений этого показателя деструкции ткани у крыс в группах с ксимедоном, 29Д и 34Д, по сравнению с контрольной группой с введением физиологического раствора. Наибольшие различия зафиксированы в зоне VH (рис. 2, В). Так, в этой зоне на 30 сут, по сравнению с группой с физиологическим раствором, этот показатель уменьшился у крыс в группах ксимедона, 29Д и 34Д соответственно в 2,6, 3 и 4,3 раза ( $p < 0,05$ ), а на 60 сут — соответственно в 2,2, 4 и 5 раз ( $p < 0,05$ ).

При сравнении значений суммарной площади патологических полостей в группе с ксимедоном с соответствующими значениями в группе 29Д и группе 34Д на 30 и 60 сут показано уменьшение данного показателя в обеих группах с новыми аналогами ксимедона. Это повышение сохранности ткани выявлено в VH, VF и DREZ. Так, в VH, по сравнению с группой с ксимедоном, в группе 29Д показатель суммарной площади патологических полостей уменьшается в 1,2 раза на 30 сут и в 1,8 раза — на 60 сут, а в группе 34Д этот показатель уменьшается в 1,7 раза на 30 сут и в 2,2 раза — на 60 сут ( $p < 0,05$ ). В VF этот показатель уменьшается в группе 29Д в 1,3 раза на 30 сут и в 1,4 раза — на 60 сут; в группе 34Д уменьшается в 1,3 раза на 30 сут и в 1,2 раза — на 60 сут ( $p < 0,05$ ). В этом отношении наиболее показательны результаты в DREZ, где суммарная площадь патологических полостей на 30 сут в группах 29Д и 34Д меньше соответственно в 3,1 и 1,8 раза, чем в группе ксимедона, а на 60 сут соответственно в 3,8 и 1,7 раза ( $p < 0,05$ ). По этому показателю выявлены достоверные различия между группами 29Д и 34Д на обоих сроках наблюдений. В DREZ и LF сум-

марная площадь патологических полостей в группе 29Д достоверно меньше на 30 сут соответственно в 1,8 и 1,5 раза, а на 60 сут соответственно в 2,3 и 1,6 раза, чем в группе 34Д, за исключением зоны VH, в которой показатель суммарной площади патологических полостей в 1,4 раза меньше на 30 сут и в 1,2 раза меньше на 60 сут, по сравнению с соответствующими показателями в группе 29Д ( $p < 0,05$ ).

**GFAP-иммунопозитивные клетки.** В группе 29Д при сравнении с группой с ксимедоном выявлены достоверные различия в количестве иммунопозитивных клеток в исследованных зонах белого вещества спинного мозга крыс на 60 сут эксперимента. Количество GFAP<sup>+</sup>-клеток достоверно больше в группе 29Д на 28,4 и 44,3 % в VF и CST, соответственно ( $p < 0,05$ ). В сером веществе, VH, наблюдается обратная картина, количество иммунопозитивных клеток в группе 29Д меньше в 1,5 раза, чем в группе ксимедона ( $p < 0,05$ ). В белом и сером веществе, во всех зонах подсчета, кроме VF, количество GFAP<sup>+</sup>-клеток в группе 34Д меньше, чем в группе ксимедона ( $p < 0,05$ ). Наибольшая разница отмечена в DREZ (рис. 3, А1). В этой зоне количество клеток в группе 34Д превышает аналогичный показатель в группе ксимедона в 2,2 раза. В остальных зонах морфометрии значения в группе 34Д меньше на 30 – 40 %.

При оценке оптической плотности белка GFAP установлено ее снижение практически во всех исследованных зонах серого вещества в группе 29Д и 34Д по сравнению с группой с ксимедоном. В DREZ (рис. 3, А2) абсолютная величина оптической плотности белка GFAP, наоборот, достоверно увеличена в группе 29Д в 2,9 раза при сравнении с группой с ксимедоном ( $p < 0,05$ ).

**S100B-иммунопозитивные клетки.** Подсчет S100B<sup>+</sup>-клеток показал увеличение их количества в каждой из исследуемых зон в группе 24Д по сравнению с группой с ксимедоном. Так, в группе 29Д в зонах белого вещества (VF, CST) зарегистрировано достоверное увеличение в 2,4 раза количества данных иммунопозитивных клеток ( $p < 0,05$ ). Сравнение группы 34Д и группы с ксимедоном выявило уменьшение количества данных клеток в ткани спинного мозга крыс в

Показатель теста Ротарод у крыс с дозированной КТСМ (с,  $M \pm m$ )

Группа крыс	n	Сутки после операции			
		7	14	30	60
Физиологический раствор	10	2,05 ± 1,17	2,98 ± 1,75	8,40 ± 1,60	11,29 ± 1,79
Ксимедон	10	0,50 ± 0,54	1,65 ± 0,86	16,48 ± 2,63*	36,22 ± 1,91*
29Д	10	4,00 ± 5,03	4,29 ± 4,39	29,11 ± 3,95*#	61,16 ± 2,85*#
34Д	10	1,78 ± 2,05	3,17 ± 2,48*	31,68 ± 3,56*#	62,73 ± 3,46*

n — число животных в группе;

\*  $p < 0,05$  при сравнении с показателями крыс с введением физиологического раствора;

#  $p < 0,05$  при сравнении с показателями крыс с введением ксимедона.

группе с этим новым аналогом ксимедона на 37,7 и 26,3 %, соответственно, в VH и DREZ ( $p < 0,05$ ).

В группе 29Д и 34Д при сравнении с группой с ксимедоном не выявлены достоверные различия в оптической плотности белка S100B ни в одной из исследованных зон серого и белого вещества.

**AQP4-иммунопозитивные клетки.** Результаты подсчёта количества AQP4<sup>+</sup>-клеток в белом и сером веществе показали, что только в СС между группой 24Д и группой с ксимедоном существует достоверная разница, с преобладанием количества иммунопозитивных клеток в группе 24Д на 9 % ( $p < 0,05$ ). Между группой 34Д и группой с ксимедоном по данному критерию достоверное различие обнаружено в VH, DREZ и CST. В VH количество иммунопозитивных клеток в группе 34Д в 1,5 раза больше, чем в группе с ксимедоном. Одновременно с этим в группе 34Д зарегистрировано снижение количества AQP4<sup>+</sup>-клеток в DREZ и CST на 40,7 % (рис. 3, А1 и Б1) ( $p < 0,05$ ). При сравнении животных группы 24Д и 34Д и группы с ксимедоном установлено, что абсолютная величина оптической плотности белка AQP4 увеличивается во всех зонах, кроме СС.

**GFAP/S100B-иммунопозитивные клетки.** Количество GFAP<sup>+</sup>/S100B<sup>+</sup>-клеток достоверно увеличилось в 2 раза в СС и CST в группе 24Д, в то время как в VH, DREZ и VF их число не отличалось от группы с введением ксимедона. Снижение количества данных клеток в группе 34Д зарегистрировано только в DREZ ( $p < 0,05$ ) (рис. 3, А1).

**GFAP/S100B/AQP4-иммунопозитивные клетки.** Результаты подсчета количества GFAP<sup>+</sup>/S100B<sup>+</sup>/AQP4<sup>+</sup>-клеток показали, что в группе 24Д существует достоверное увеличение в DREZ и CST (рис. 3, А1 и Б1), по сравнению с группой ксимедона. В группе 34Д достоверное уменьшение (на 46 %) количества клеток по сравнению с группой с ксимедоном наблюдается только в белом веществе ( $p < 0,05$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при травме спинного мозга производные пиримидина стимулируют восстановление двигательной функции, поддерживают сохранность ткани и влияют на популяцию астроцитов.

По критерию восстановления двигательной функции новые аналоги ксимедона, соединения 29Д и 34Д, оказались более эффективными, чем ксимедон. Изучение на модели травмы спинного мозга крысы свойств производного пиримидина противоопухолевого препарата Imatinib (Gleevec<sup>®</sup>, Novartis), обладающего активностью ингибитора тирозинкиназы, показало улучшение двигательной функции, а также функции мочевого пузыря, сохранности ткани и снижение экспрессии ингибитора роста аксонов хондроитинсульфат протеогликана [4]. Однако в другом исследовании при тех же экспериментальных условиях этот препарат только улучшал функцию мочевого пузыря и не оказывал влияния на восстановление двигательной функции, со-

хранность ткани и инвазию в область повреждения CD68<sup>+</sup>-клеток [11].

Каждое из 3 исследованных нами производных пиримидина обеспечивает большую сохранность ткани спинного мозга, т.к. существенно уменьшает суммарную площадь патологических полостей. По этому показателю новые аналоги ксимедона, соединения 29Д и 34Д, оказываются более эффективными, чем ксимедон. При сравнении их действия по данному критерию установлено, что соединение 29Д оказывается более эффективным в DREZ, а соединение 34Д в большей мере поддерживает сохранность ткани в VH.

Астроциты вырабатывают нейротрофические факторы, молекулы внеклеточного матрикса, обеспечивают энергетические потребности нейронов, участвуют в регуляции синаптической передачи и пластичности, поддерживают во внеклеточном пространстве баланс ионов и оптимальное содержание нейромедиаторов. Именно поэтому астроциты рассматриваются как потенциальные мишени для новых терапевтических воздействий при травме спинного мозга [6]. Проявляющийся при патологии астроглиоз характеризуется выраженным изменением экспрессии ряда специфических молекул и является универсальным маркером развития патологических реакций в ЦНС. При этом в условиях значительных нарушений астроциты образуют барьер, отделяющий неповрежденную ткань от ткани с глубокими патологическими сдвигами. Становится все более очевидным, что астроглиоз играет существенную роль в контроле воспалительного ответа и в восстановлении поврежденной ткани.

К 60 сут эксперимента в большинстве исследованных зон серого вещества количество GFAP<sup>+</sup>-астроцитов при введении новых аналогов ксимедона уменьшается параллельно с уменьшением экспрессии этого маркерного белка промежуточных филаментов. Исключение составляют DREZ, где уровень экспрессии GFAP при введении соединения 29Д в 3 раза больше, чем при введении ксимедона. Разнонаправленное действие производных пиримидина на астроциты в различных зонах может быть связано с их известной гетерогенностью [9] и возможными различиями в распределении их подтипов по зонам спинного мозга. В белом веществе количество GFAP<sup>+</sup>-клеток под влиянием соединения 29Д увеличивается, а под влиянием соединения 34Д – уменьшается. Подобные различия в действии соединений 29Д и 34Д на фоне сходного по эффективности влияния на восстановление двигательной функции могут свидетельствовать о различных клеточных и молекулярных механизмах действия, что согласуется с влиянием этих соединений на сохранность ткани.

Практически во всех зонах спинного мозга нами выявлено снижение экспрессии белка водного канала AQP4, который в этом отделе ЦНС присутствует только в астроцитах. Однако в работе [12] на той же экспериментальной модели КТСМ крысы через 30 сут по-

сле однократного введения рекомбинантного эритропоэтина человека показано увеличение экспрессии AQP4 в ряде зон серого и белого вещества в сочетании с улучшением двигательной функции. По мнению авторов, стимулирование экспрессии AQP4 может приводить к уменьшению отека ткани при травме спинного мозга. Однако взаимосвязь этого последствия нейротравмы с уровнем экспрессии AQP4 пока остается неясной.

## ВЫВОД

Ксимедон и его аналоги L-аскорбат и *para*-аминобензоат 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-оксиэтил)пиримидона-2 (30 мг/кг, внутривенно, ежедневно в течение 30 сут) при травме спинного мозга стимулируют восстановление двигательной функции, поддерживают сохранность ткани и влияют на популяцию астроцитов у крыс с КТСМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00014).

## ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Лебедев, С. В. Тимофеев, А. В. Жарков и др., *Бюл. экперим. биол. и мед.*, **146**(10), 471 – 476 (2008).

2. Ю. А. Чельшев, Р. Х. Хафизьянова, И. С. Рагинов и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **63**(4), 17 – 19 (2000).
3. Ю. А. Чельшев, Г. В. Черепнев, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **64**(3), 67 – 71 (2001).
4. M. B. Abrams, I. Nilsson, S. A. Lewandowski, et al., *PLoS One*, **7**(6), e38760 (2012).
5. A. Cox, A. Varma, N. Banik, *Metab. Brain Dis.*, **30**(2), 473 – 482 (2015).
6. M. E. Hamby, M. V. Sofroniew, *Neurotherapeutics*, **7**(4), 494 – 506 (2010).
7. B. K. Kwon, E. Okon, J. Hillyer, et al., *J. Neurotrauma*, **28**(8), 1545 – 1588 (2011).
8. R. Masgutov, I. Raginov, G. Fomina, et al., *Cell Mol. Neurobiol.*, **26**(7 – 8), 1411 – 1419 (2006).
9. V. Matyash, H. Kettenmann, *Brain Res. Rev.*, **63**(1 – 2), 2 – 10 (2010).
10. K. G. Sharp, K. M. Yee, O. Steward, *Exp. Neurol.*, **254**, 1 – 11 (2014).
11. C. H. Tator, R. Hashimoto, A. Raich, et al., *J. Neurosurg. Spine*, **17**(1 Suppl), 157 – 229 (2012).
12. L. Vitellaro-Zuccarello, S. Mazzetti, L. Madaschi, *Neuroscience*, **151**(2), 452 – 466 (2008).

Поступила 18.11.15

## NEUROPROTECTIVE ACTION OF NEW PYRIMIDINE DERIVATIVES ON RAT SPINAL CORD INJURY

T. V. Povysheva<sup>1</sup>, V. E. Semenov<sup>1</sup>, I. V. Galyametdinova<sup>2</sup>, V. S. Reznik<sup>2</sup>, K. S. Knni<sup>1</sup>, P. E. Kolesnikov<sup>1</sup>, S. V. Kuznetsova<sup>3</sup>, and Yu. A. Chelyshev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia

<sup>2</sup> A. E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, ul. Arbuzova 8, Kazan, Tatarstan, 420088 Russia

<sup>3</sup> Interdisciplinary Centre of Analytical Microscopy, Kazan Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420011, Russia

Effects of the systemic administration of xymedon and its derivatives-L-ascorbate and *para*-aminobenzoate 1,2-dihydro-4,6-dimethyl-1-(2-hydroxyethyl)pyrimid-2-one (compounds 29D and 34D, respectively) – have been studied on a contusion model (Th8 level) of spinal cord injury in rats. Experiments showed the impact of treatment on recovery of motor function, spinal cord tissue safety, population and phenotypic characteristics of astrocytes in the zones of gray and white matter. Xymedon produced a stimulating effect on recovery of the locomotor function. In this respect, compounds 29D and 34D were more effective than xymedon, although no significant differences between the action of compounds 29D and 34D was observed. Each of the three investigated pyrimidine derivatives significantly reduced the total area of pathologic cavities in spinal cord. In this respect, compounds 29D and 34D were also more effective than xymedon. Compound 29D exhibited a more pronounced effect in the dorsal root entry zone (DREZ), while compound 34D more significantly supported preservation of tissue in the ventral horns (VHs). Within 60 days after administration of compounds of 29D and 34D, the number of GFAP<sup>+</sup> astrocytes in gray matter zones decreased as compared to the group treated with xymedon, and the expression of this marker protein of intermediate filaments decreased. In the white matter, the number of GFAP<sup>+</sup> cells increased under the influence of compound 29D and decreased under the action of compound 34D. Differences between the effects of compounds 29D and 34D (on the background of their equal influence on recovery of the locomotor function) may be indicative of different cellular and molecular mechanisms of action, in agreement with data on their action on tissue safety.

**Keywords:** spinal cord injury; pyrimidine; xymedon; neuroregeneration; rats.