

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-179-187](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-179-187)
УДК 615.21; 616.831-001.31



Оригинальная статья / Research article

Оценка нейропротекторной активности нового производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс

В. А. Приходько^{1,2*}, А. В. Кан¹, Ю. И. Сысоев^{1,2,3,4}, И. А. Титович¹, Н. А. Анисимова¹, С. В. Оковитый^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт мозга человека имени Н. П. Бехтерева Российской академии наук», 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12А

³ Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9, пом. 1050

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук», 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

* Контактное лицо: Приходько Вероника Александровна. E-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

ORCID: В. А. Приходько – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; А. В. Кан – <https://orcid.org/0000-0002-7833-9878>; Ю. И. Сысоев – <https://orcid.org/0000-0003-4199-5318>;

И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Н. А. Анисимова – <https://orcid.org/0000-0002-2620-2976>; С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 13.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Поиск и изучение новых лекарственных средств, способных снижать выраженность неврологического дефицита у пациентов, перенесших черепно-мозговую травму, является актуальной задачей фармакологии. Среди потенциальных нейропротекторных средств следует отметить хромонсодержащие производные аллилморфолина, для которых *in vitro* была показана блокирующая активность в отношении ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и рецепторов N-метил-D-аспартата.

Цель. Оценка нейропротекторной активности производного аллилморфолина (E)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4H-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорида (33b) *in vivo* на модели черепно-мозговой травмы у крыс.

Материалы и методы. Черепно-мозговую травму у крыс моделировали методом контролируемого кортикального удара. Производное аллилморфолина вводили в дозах 1, 10 и 50 мг/кг внутривенно спустя час после травмы и далее 1 раз в сутки в течение 6 дней. Степень неврологического дефицита у животных оценивали в тестах «Стимулирование конечностей», «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Сужающаяся дорожка» и «Цилиндр».

Результаты и обсуждение. Производное аллилморфолина ни в одной из вводимых доз не оказывало положительного влияния на двигательную функцию или исследовательское поведение травмированных животных. Доза 10 мг/кг вызывала у травмированных животных снижение исследовательской активности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», что согласуется с ранее показанным седативным действием изучаемого соединения у рыб *Danio rerio*.

Заключение. В настоящем исследовании было показано отсутствие нейропротекторного действия производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс, несмотря на показанную ранее *in vitro* активность по отношению к биологическим мишеням, играющим ведущую роль в развитии патологических процессов и функциональном восстановлении после черепно-мозговой травмы. Полученные результаты показывают важность проведения исследований потенциальных нейропротекторных средств *in vivo*.

Ключевые слова: производные аллилморфолина, черепно-мозговая травма, нейропротекция, нейропротекторные средства, нейрореабилитация, нейрофармакология

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. В. А. Приходько анализировала литературные данные, провела эксперименты, анализировала и интерпретировала данные, подготовила текст рукописи и иллюстрации. А. В. Кан, И. А. Титович анализировали литературные данные, провели эксперименты, анализировали данные, подготовили текст рукописи. Ю. И. Сысоев анализировал литературные данные, разработал дизайн исследования, анализировал и интерпретировал данные, подготовил и редактировал текст рукописи. С. В. Оковитый и Н. А. Анисимова разработали дизайн исследования, интерпретировали данные, редактировали текст рукописи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Приходько В. А., Кан А. В., Сысоев Ю. И., Титович И. А., Анисимова Н. А., Оковитый С. В. Оценка нейропротекторной активности нового производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):179–187. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-179-187](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-179-187)

Evaluation of the Neuroprotective Activity of a New Allylmorpholine Derivative in a Rat Model of Traumatic Brain Injury

Veronika A. Prihodko^{1,2}, Aleksandra V. Kan¹, Yuriy I. Sysoev^{1,2,3,4}, Irina A. Titovich¹, Natalia A. Anisimova¹, Sergey V. Okovityi^{1,2}

© Приходько В. А., Кан А. В., Сысоев Ю. И., Титович И. А., Анисимова Н. А., Оковитый С. В., 2021

© Prihodko V. A., Kan A. V., Sysoev Yu. I., Titovich I. A., Anisimova N. A., Okovityi S. V., 2021

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia
² N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, 12A, Akademik Pavlov str., St. Petersburg, 197376, Russia
³ Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, 7-9/1050, Universitetskaya emb., St. Petersburg, 199034, Russia
⁴ Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 6, Makarova emb., St. Petersburg, 199034, Russia

*Corresponding author: Veronika A. Prikhodko. E-mail: veronika.prikhodko@pharminnotech.com

ORCID: Veronika A. Prikhodko – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; Aleksandra V. Kan – <https://orcid.org/0000-0002-7833-9878>; Yuriy I. Sysoev – <https://orcid.org/0000-0003-4199-5318>; Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Natalia A. Anisimova – <https://orcid.org/0000-0002-2620-2976>; Sergey V. Okovityi – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Received: 20.10.2021

Revised: 13.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. The search for and development of new drugs capable of reducing the severity of neurological deficit in traumatic brain injury are a critical task for investigational pharmacology. Chromone-containing allylmorpholines are a new group of neuroprotective drug candidates that have been shown to inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, and block N-methyl-D-aspartate receptors *in vitro*.

Aim. This study aimed to evaluate the neuroprotective activity of the allylmorpholine derivative (*E*)-4-[3-(8-bromo-6-methyl-4-oxo-4*H*-chromen-3-yl)-1-cyclohexylallyl]morpholin-4-ium chloride (33b) *in vivo* using a rat model of traumatic brain injury.

Materials and methods. Traumatic brain injury was induced using the controlled cortical impact model. The allylmorpholine derivative was administered intraperitoneally at 1, 10, or 50 mg × kg⁻¹ b.w. at 1 h after trauma induction, and then daily for the next 6 d. The neurological deficit was assessed using the Limb Placing, Open Field, Elevated Plus Maze, Beam Walking, and Cylinder tests.

Results and discussion. At all doses administered, the allylmorpholine derivative had no positive effect on the motor function or exploratory behavior following traumatic brain injury. In the Elevated Plus Maze, 10 mg × kg⁻¹ b.w. of the compound further suppressed exploratory behaviour in the injured animals, which appears to be consistent with its sedative properties observed previously in zebrafish.

Conclusion. Despite the previously described *in vitro* affinity of allylmorpholines towards several molecular targets crucial for the pathogenesis of brain trauma and posttraumatic functional recovery, an allylmorpholine derivative had no neuroprotective effect in a rat model of traumatic brain injury in this study. These results further emphasize the importance of *in vivo* evaluation of potential neuroprotective drug candidates.

Keywords: allylmorpholines; allylmorpholine derivatives; brain injuries, traumatic; neuroprotection; neuroprotective agents; neurological rehabilitation; neuropharmacology

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Veronika A. Prikhodko analyzed the literature, conducted the experiments, analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript, and prepared the figures. Aleksandra V. Kan and Irina A. Titovich analyzed the literature, conducted the experiments, analyzed the data, and drafted the manuscript. Yuriy I. Sysoev analyzed the literature, designed the study, analyzed and interpreted the data, drafted and reviewed the manuscript. Sergey V. Okovityi and Natalia A. Anisimova designed the study, interpreted the data, and reviewed the manuscript.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Prikhodko V. A., Kan A. V., Sysoev Yu. I., Titovich I. A., Anisimova N. A., Okovityi S. V. Evaluation of the neuroprotective activity of a new allylmorpholine derivative in a rat model of traumatic brain injury. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4-1):179–187. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-179-187](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-179-187)

ВВЕДЕНИЕ

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих проблем современного здравоохранения ввиду высокого уровня летальности, инвалидизации и высокой распространенности среди разных слоев населения, что наносит значительный социальный и экономический ущерб. По современным оценкам, общемировая ежегодная заболеваемость ЧМТ вне зависимости от этиологии и степени тяжести составляет около 939 случаев на 100 тыс., а распространенность – до 15 % населения [1]. Общая летальность при ЧМТ составляет 5-10%; при тяжелых ЧМТ летальный исход наблюдается у 41–85 % пациентов. Последствиями ЧМТ могут быть нарушения двигательной функции, когнитивный и мнестический дефицит, снижение или полная утрата работоспособности [2]. Для лечения ЧМТ, восстановления в посттравматический период и предотвращения развития осложнений необходимо проведение рациональной меди-

каментозной терапии с использованием нейропротекторных средств различных групп. Фармакологическая нейропротекция преимущественно направлена на коррекцию метаболизма нейронов, а также повышение их устойчивости в условиях кислородного и энергетического дефицита [3]. В настоящее время в рамках комплексной травматической реабилитации после ЧМТ возможно применение ноотропных средств, антигипоксантов и антиоксидантов, которые предотвращают или уменьшают образование свободных радикалов, повышают выживаемость нейронов головного мозга в условиях гипоксии или ишемии, увеличивают концентрацию ацетилхолина в головном мозге, предотвращают активацию процессов перекисного окисления липидов [4]. Тем не менее, уровень доказанности клинической эффективности и безопасности нейропротекторных препаратов указанных групп, представленных на современном фармацевтическом рынке, остается недостаточным [5]. В связи с вышесказанным поиск и изучение новых ле-

карственных средств с нейропротекторной активностью являются актуальной задачей современной экспериментальной фармакологии [6, 7].

Потенциальный интерес для изучения в качестве средств коррекции последствий ЧМТ представляют хромонсодержащие производные аллилморфолина (ПАМ), впервые полученные на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ). Для данных соединений была показана *in vitro* блокирующая активность в отношении ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и рецепторов N-метил-D-аспартата [8]. Согласно литературным данным, производные морфолина различной структуры способны повышать жизнеспособность нейронов головного мозга, способствуя нормализации двигательной активности, когнитивных и мнестических функций при травматических, ишемических и дегенеративных поражениях центральной нервной системы [9]. Вышесказанное позволяет предположить наличие нейропротекторной активности у ПАМ.

Целью настоящего исследования было изучение нейропротекторной активности производного аллилморфолина (E)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4H-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]-морфолин-4-ия хлорида (33b) *in vivo* на модели ЧМТ у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ № 199н от 01.04.16 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» после одобрения биоэтической комиссией СПХФУ. Эксперименты были выполнены на 50 белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, полученных из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл., РФ) из одного привоза и прошедших карантин в течение

14 д. Крысы получали корм «Полнораационный комбикорм для лабораторных животных» (ООО «Лабораторкорм», РФ) и воду, соответствующую требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая». Доступ к корму и воде был обеспечен *ad libitum*. Непосредственно перед началом исследования животные были рандомизированы методом случайных чисел на 5 групп: интактная (Интакт; NaCl 0,9 %, $n = 10$), контрольная (Контроль; ЧМТ + NaCl 0,9 %, $n = 10$), ЧМТ + 33b 1 мг/кг ($n = 10$), ЧМТ + 33b 10 мг/кг ($n = 10$) и ЧМТ + 33b 50 мг/кг ($n = 10$).

Эксперименты проводили в соответствии со схемой, изображенной на рисунке 1.

ЧМТ моделировали методом контролируемого кортикального удара у животных контрольной и опытных групп. Крыс наркотизировали с помощью внутрибрюшинной инъекции раствора хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг. Осуществляли трепанацию в левой лобной части черепа над зоной двигательной коры. Центр трепанационного отверстия находился на 3,0 мм роstralнее и 2,0 мм медиальнее бregмы. Далее в трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 3,0 мм и высотой 10 см, с ходом 4,0 мм, по которому груз весом 50 г, проскальзывая в стальной трубке, совершал удар. Высверленную черепную пластину возвращали на место и ушивали разрез кожи. Шов обрабатывали антисептическим средством (5 % раствором йода) непосредственно после наложения и в течение последующих 6 дней [10].

(E)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4H-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорид (33b) (рис. 2) вводили внутрибрюшинно в виде свежеприготовленных водных раствора (1 мг/кг) или суспензии (10, 50 мг/кг; эмульгатор твин-80) через 1 ч после индукции ЧМТ и далее 1 р/д в течение последующих



Рисунок 1. Схема эксперимента.

ЧМТ – черепно-мозговая травма; ЛС – лекарственные средства; СК – «Стимулирование конечностей»; ОП – «Открытое поле»; ПКЛ – «Приподнятый крестообразный лабиринт»; СД – «Сужающаяся дорожка»

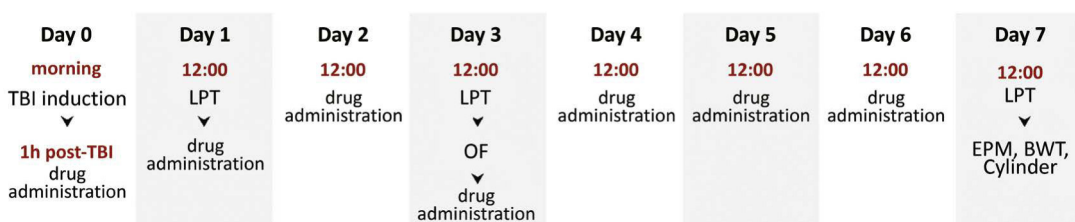


Figure 1. Experimental schedule.

TBI – traumatic brain injury; LPT – Limb Placing test; OF – Open Field; EPM – Elevated Plus Maze; BWT – Beam Walking test

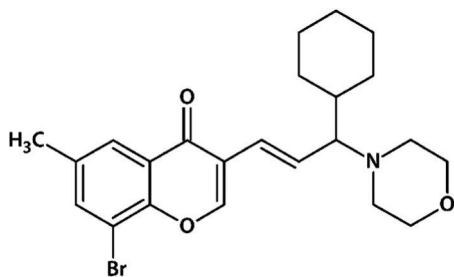


Рисунок 2. Структурная формула (E)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4H-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорида (33b)

Figure 2. Structural formula of (E)-4-[3-(8-bromo-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-3-yl)-1-cyclohexylallyl]morpholin-4-ium chloride (33b)

6 дней. Интактным и контрольным животным вводили физиологический раствор в эквивалентных количествах в том же режиме.

На 1-е, 3-и и 7-е сутки после травмы у крыс оценивали выраженность неврологического дефицита с помощью теста «Стимулирование конечностей» (СК). Данный тест заключался в оценке ответа передней и задней контралатеральных конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию в 7 последовательных испытаниях. Для оценки нарушений в работе конечностей использовалась следующая система подсчета: 2 балла – крыса полностью выполняла испытание; 1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой в более чем 2 с и/или не полностью; 0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности. Итоговый результат представляли в виде суммы баллов; максимально возможное количество баллов было равно 14 [11].

На 3-и сутки оценивали общую двигательную и исследовательскую активность в тесте «Открытое поле» (ОП), фиксируя передвижения животных в установке (ООО «НПК Открытая наука», Россия) при помощи видеокамеры в течение 3 мин. Автоматическую обработку полученных видеозаписей в ОП осуществляли с помощью программы VideoMot (TSE Systems, Германия). Оценивали пройденную дистанцию, среднюю скорость движения, число посещенных участков поля, число замираний, суммарное время замираний, время нахождения в центре поля, количество грумингов, стоек и заглядываний в отверстия-«норки» [12].

На 7-е сутки проводили тесты СК, «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «Цилиндр» и «Сужающаяся дорожка» (СД). Тест ПКЛ позволяет оценить уровень тревожности, общей двигательной и исследовательской активности животных. Проводили видеокomпьютерную регистрацию передвижений животных в установке (ООО «НПК Открытая наука», Россия) в течении 3 минут, после чего определяли в ручном режиме время нахождения в открытых рукавах (ОР), в закрытых рукавах (ЗР) и в центре, количество заходов в ОР и ЗР, количество стоек, грумингов, выглядываний из ЗР и свисаний с ОР [13].

В тесте «Цилиндр» оценивали асимметрию использования животным передних конечностей в процессе исследования стенок цилиндра. Крысу помещали в прозрачный пластмассовый цилиндр (ООО «НПК Открытая наука», Россия) и проводили видеорегистрацию ее движений. Время тестирования не ограничивали, добиваясь не менее 10 касаний стенок цилиндра. Просмотр видеозаписи проводили в покадровом режиме, подсчитывая количество актов независимого использования латеральной и контралатеральной к месту повреждения конечностей во время исследования стенки цилиндра после подъема на задние лапы, а также одновременного использования обеих лап. Результаты представляли как процент использования контралатеральной конечности от общего числа поведенческих актов (КЛ) и рассчитывали по формуле [14]:

$$\text{КЛ} = (\text{Контр} + 0,5 \text{ Одновр}) / (\text{Ипси} + \text{Контр} + \text{Одновр}) \times 100,$$

где Контр – контралатеральная к месту повреждения конечность; Одновр – одновременное использование обеих передних конечностей; Ипси – ипсилатеральная к месту повреждения конечность.

Тест СД позволяет оценить выраженность сенсомоторного дефицита передних и задних конечностей. Установка (ООО «НПК Открытая наука», Россия) представляет собой две плавно сужающиеся дорожки длиной 165 см, располагающиеся непосредственно друг под другом. Нижняя дорожка выполняет функцию платформы, на которой оказываются конечности животного во время соскальзывания с верхней дорожки. В конце дорожек находится черный ящик, который является конечной целью животного. Перед моделированием ЧМТ крыс обучали пересекать СД в течение 3 последовательных дней. Во время тестирования проводили запись движений животных на видеокамеру. Далее в покадровом режиме просмотра подсчитывали количество постановок контралатеральной к месту повреждения конечности на нижнюю дорожку (ошибок), количество соскальзываний с верхней дорожки на нижнюю и общее количество шагов. Подсчет количества ошибок, количества соскальзываний и общее количество шагов для передней и задней контралатеральных конечностей проводили отдельно. Полученные в результате трех попыток данные усредняли, степень сенсомоторного дефицита (СМД) вычисляли по формуле и выражали в процентах [15]:

$$\text{СМД} = \text{Ошибки} + 0,5 \times \text{Соскальзывания} / \text{Общее количество шагов} \times 100$$

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программного обеспечения Prism 8.2 (GraphPad Software, США). Проверяли нормальность распределения количественных признаков с помощью W-критерия Шапиро – Уилка. Да-

лее оценивали значимость различий: при нормальном распределении количественных признаков с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с *post hoc* тестом по Тьюки, при ненормальном распределении – с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с *post hoc* тестом по Данну. Числовые данные приведены в таблицах как среднее арифметических (M) $\pm$ ошибка среднего (m). В тесте СК данные представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вследствие травматического повреждения двигательной коры и нижележащих структур у крыс отмечалось выраженное угнетение двигательной функции, а также исследовательской активности. В тесте СК у травмированных животных по сравнению с интактными наблюдался выраженный двигательный дефицит передних и задних конечностей на 1-е, 3-е и 7-е сутки после травмы. В целом, ни в одной из доз введение ПАМ не приводило к снижению степени двигательных нарушений в данном тесте. Однако следует отметить, что в группе, получавшей соединение в дозе 10 мг/кг, происходило частичное восстановление двигательной функции передних и задних конечностей на 7-е сутки в среднем на 38,6 % ($p < 0,05$) (таблица 1).

Таблица 1. Влияние производного аллилморфолина 33b на функцию конечностей животных в тесте «Стимулирование конечностей»

Table 1. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on animal limb function in the Limb Placing test

Группа Group	1-й день Day 1	3-й день Day 3	7-й день Day 7
Интакт Intact	14 (14;14)**	14 (14;14)**	14 (14;14)**
Контроль Control	1,5 (0;5)	1,4 (0;5)	3,9 (1;6)
33b 1 мг/кг 33b 1 mg · kg ⁻¹	0,9 (0;2)	2,0 (0;6)	4,8 (2;7)
33b 10 мг/кг 33b 10 mg · kg ⁻¹	1,1 (0;5)	2,8 (0;5)	5,4 (3;10)*
33b 50 мг/кг 33b 50 mg · kg ⁻¹	0,7 (0;4)	1,8 (0;5)	4,9 (0;10)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с значением контрольной группы; ** $p < 0,01$ по сравнению с значением контрольной группы.

Note. * $p < 0,05$ vs. Control; ** $p < 0,01$ vs. Control.

В тесте ОП ЧМТ у крыс приводила к снижению двигательной и поисково-исследовательской активности по сравнению с интактной группой, что проявлялось в уменьшении количества грумингов на 74 % ($p < 0,05$) и заглядываний в норки на 96 % ($p < 0,01$). Стоит отметить тенденцию к снижению пройденной дистанции и количества стоек у таких животных, а также увеличению времени нахождения в центре ОП. ПАМ в диапазоне изучаемых доз не оказывало статистически значимого влияния на поведение травмированных животных в данном тесте (рисунок 3).

В тесте ПКЛ не было выявлено каких-либо статистически значимых изменений поведения на 7-е сутки после ЧМТ у травмированных крыс. ПАМ в дозе 10 мг/кг у животных с травмой уменьшало количество заходов в ЗР и свисаний на 74 % и 80 % соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях) (рисунок 4).

Несмотря на отсутствие статистической значимости, в тесте «Цилиндр» частота использования контралатеральной конечности имела выраженную тенденцию к снижению у животных, перенесших ЧМТ. Как и в предыдущих тестах, изучаемое соединение не оказывало какого-либо положительного эффекта на двигательную функцию передней лапы, расположенной контралатерально к месту повреждения (рисунок 5).

В тесте СД у травмированных крыс степень сенсомоторного дефицита передних и задних конечностей достигала 40 % ($p < 0,01$ по сравнению с Интактом в обоих случаях). ПАМ ни в одной из доз не оказывало значимого влияния на двигательную функцию животных с ЧМТ (рисунок 6).

Несмотря на подтвержденные *in vitro* молекулярные механизмы действия ПАМ 33b [8], в настоящем исследовании не было обнаружено нейропротекторной активности у этого соединения на модели ЧМТ у крыс в дозах 1, 10 или 50 мг/кг. Наблюдаемые положительные эффекты дозы 10 мг/кг в тесте СК не были подтверждены в других, более объективных тестах. Наиболее вероятными причинами отсутствия нейропротекторного действия могут быть особенности фармакокинетики, в частности – метаболизма соединения 33b, не учтенные дизайном исследования.

Указанные дозы были выбраны с учетом предварительно определенного значения медианной летальной дозы LD₅₀ 33b при внутрибрюшинном введении (320 ± 30 мг/кг для мышей). В пользу потенциальной эффективности выбранных доз свидетельствует наличие центральной активности у данного соединения и его аналогов в эквивалентных диапазонах концентраций у рыб *Danio rerio* [16–18].

Выбранный режим введения ранее позволил добиться реализации нейропротекторного эффекта экспериментальных соединений 6-оксо-1-фенил-2-фениламино-1,6-дигидропиримидин-4-ола (мафедина) [19, 20] и [(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата (ФДЭС) [10], однако может не являться оптимальным для группы ПАМ. Кроме этого, биодоступность 33b при внутрибрюшинном введении может быть снижена ввиду недостаточной растворимости соединения в воде и низкой системной абсорбции из крупнодисперсных суспензий, склонных к расслоению. Так, для производных морфолина АК295 [21] и LM11A-31 [22], продемонстрировавших нейропротекторную активность на моделях ЧМТ у крыс, были использованы альтернативные пути (интраартериальный, интраназальный) и режимы введения, а вводимые препараты имели форму растворов.

С другой стороны, недостаточное проникновение соединения 33b через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), напротив, представляется маловероятным.

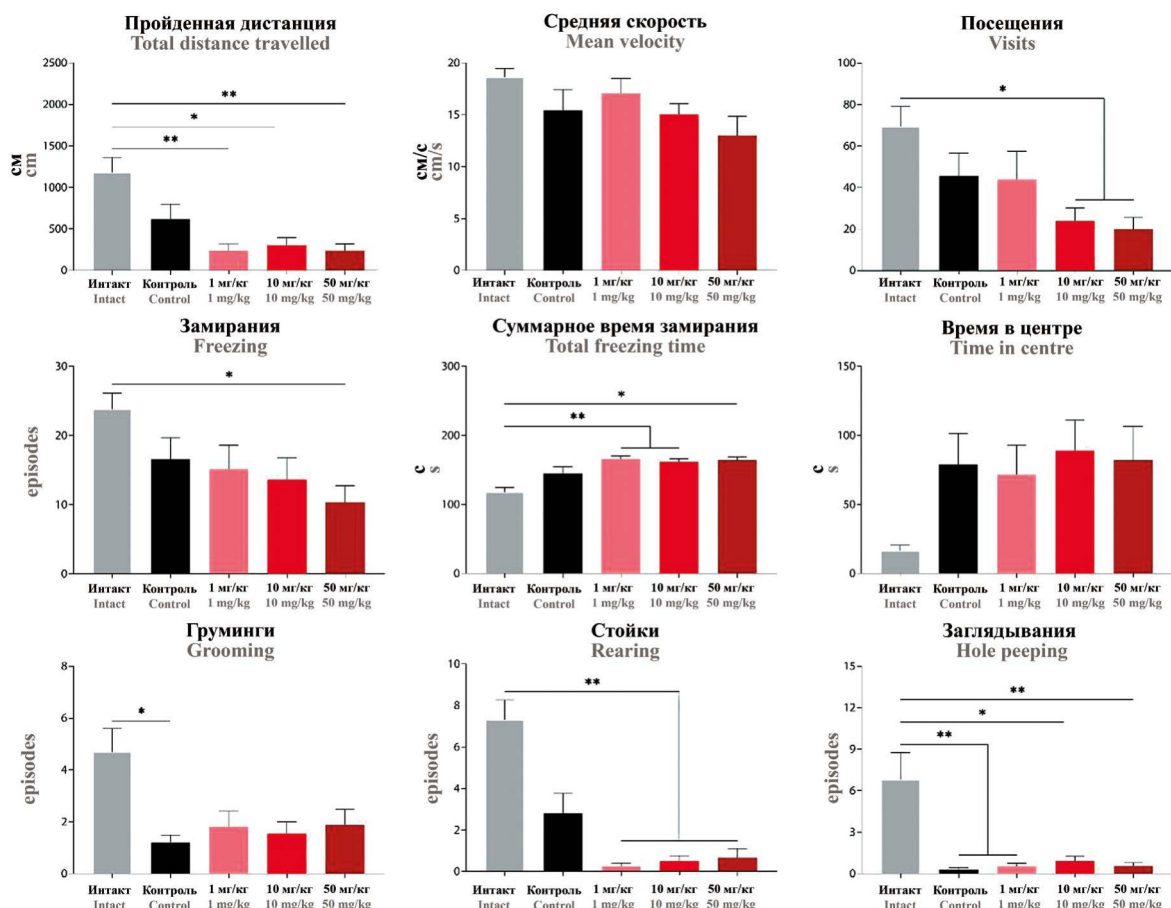


Рисунок 3. Влияние производного аллилморфолина 33b на двигательную и исследовательскую активность животных в тесте «Открытое поле».

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Figure 3. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on animal locomotion and exploratory behaviour in the Open Field.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Методами *in silico* установлено, что наличие морфолинового фрагмента способствует увеличению липофильности молекул и облегчает их диффузию через мембраны ГЭБ [23–26]. Для ЧМТ также характерно патологическое увеличение проницаемости ГЭБ, достаточное для попадания в церебральный кровоток значительных количеств даже таких высокомолекулярных соединений, как белки или нуклеиновые кислоты [27]. Кроме этого, проникновение 33b в центральную нервную систему косвенно подтверждается развитием седации, наблюдавшейся в тесте ПКЛ в настоящем исследовании, а также продемонстрированной ранее для других ПАМ в эквивалентных концентрациях в серии скрининговых экспериментов на *Danio rerio* [16–18].

Возможной причиной отсутствия ожидаемого нейропротекторного эффекта ПАМ 33b *in vivo* может быть его биотрансформация с образованием метаболитов, обладающих иным характером действия. Наряду с другими факторами, невозможность воспроизведения фармакокинетических процессов, протекающих в живом организме, является одним из основных недостатков тест-систем *in vitro* [28]. Ввиду это-

го, несмотря на их популярность и некоторые безусловные преимущества, скрининговые исследования *in vitro* являются лишь предварительной стадией для оценки возможности и необходимости последующих исследований эффективности и безопасности лекарственных средств *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании было показано отсутствие нейропротекторного действия производного аллилморфолина 33b на модели ЧМТ у крыс, несмотря на показанную ранее *in vitro* активность в отношении нескольких биологических мишеней, играющих ведущую роль в развитии патологических процессов и функциональном восстановлении после ЧМТ. Наиболее вероятными причинами отсутствия нейропротекторного действия могут быть особенности фармакокинетики, в частности – метаболизма соединения 33b, не учтенные дизайном исследования. Полученные результаты подчеркивают важность проведения оценки эффективности и безопасности потенциальных нейропротекторных средств *in vivo*.

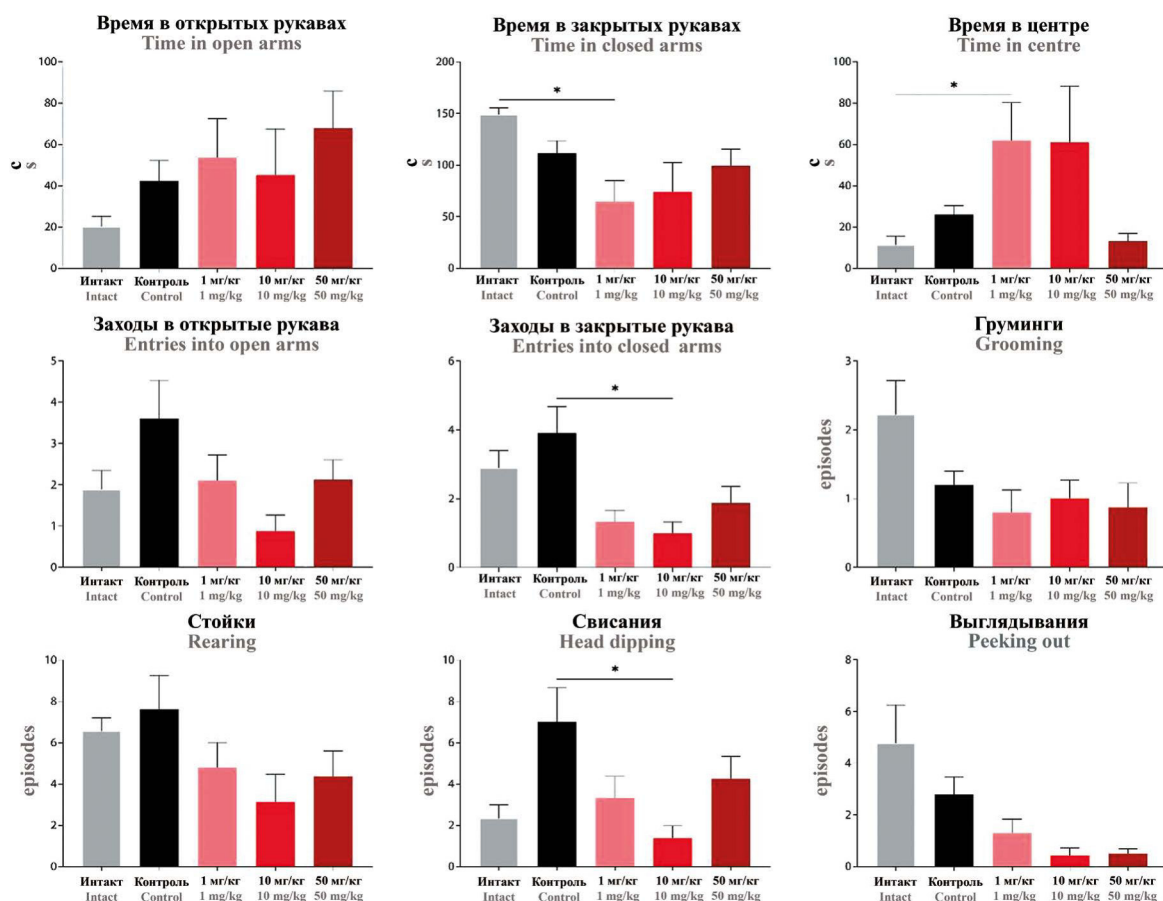


Рисунок 4. Влияние производного аллилморфолина 33b на исследовательскую активность и уровень тревожности животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».

* $p < 0,05$

Figure 4. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on animal exploratory and anxiety-like behaviour in the Elevated Plus Maze.

* $p < 0.05$

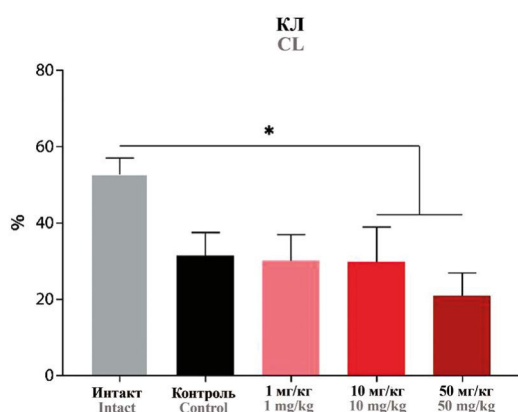


Рисунок 5. Влияние производного аллилморфолина 33b на функцию передней контралатеральной к месту повреждения конечности животных в тесте «Цилиндр».

КЛ – процент использования контралатеральной конечности от общего числа поведенческих актов; * $p < 0,05$.

Figure 5. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on the function of the forelimb contralateral to the injury in the Cylinder test.

CL – percent use of the contralateral forelimb; * $p < 0.05$

ЛИТЕРАТУРА

- Dewan M. C., Rattani A., Gupta S., Baticulon R. E., Hung Y.-C., Punchak M., Agrawal A., Adeleye A. O., Shrimel M. G., Rubiano A. M., Rosenfeld J. V., Park K. B. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 2018;1–18. DOI: 10.3171/2017.10.JNS17352.
- Крылов В. В., Петриков С. С., Талыпов А. Э., Пурас Ю. В., Солодов А. А., Левченко О. В., Григорьева Е. В., Кордонский А. Ю. Современные принципы хирургии тяжелой черепно-мозговой травмы. *Журнал им. Н. В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2013;(4):39–47.
- Loane D. J., Stoica B. A., Faden A. I. Neuroprotection for traumatic brain injury. *Handbook of Clinical Neurology*. 2015;127:343–366. DOI: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00022-2.
- Потапов А. А., Лихтерман Л. Б., Кравчук А. Д., Охлопков В. А., Александрова Е. В., Филатова М. М., Маряхин А. Д., Латышев Я. А. Легкая черепно-мозговая травма: клинические рекомендации. Москва: Ассоциация нейрохирургов России; 2016. 23 с.
- Потапов А. А., Крылов В. В., Гаврилов А. Г., Кравчук А. Д., Лихтерман Л. Б., Петриков С. С., Талыпов А. Э., Захарова Н. Е., Ошоров А. В., Сычев А. А., Александрова Е. В., Солодов А. А. Рекомендации по диагностике и лечению тяжелой черепно-мозговой травмы. Часть 2. Интенсивная терапия и нейромониторинг. *Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н. Н. Бурденко*. 2016;80(1):98–106. DOI: 10.17116/neiro201680198-10.
- Тюрников И. Н., Куркин Д. В., Литвинов А. А., Логвинова Е. А., Морковин Е. И., Бакулин Д. А., Волотова Е. В. Методы моделирования острых нарушений мозгового кровообращения, при-

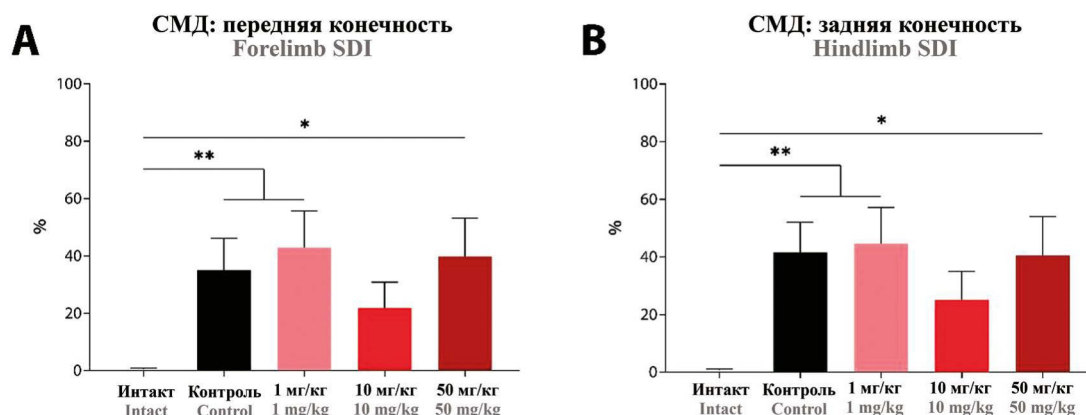


Рисунок 6. Влияние производного аллилморфолина 33b на функцию передней (А) и задней (В) контралатеральных к месту повреждения конечностей животных в тесте «Сужающаяся дорожка».

СМД – степень сенсомоторного дефицита; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Figure 6. Effects of the allylmorpholine derivative 33b on the function of the forelimb (A) and hindlimb (B) contralateral to the injury in the Beam Walking test.

SDI – Sensorimotor Deficit Index; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

меняемые при проведении доклинических исследований церебропротекторов. *Разработки и регистрация лекарственных средств*. 2018;(1):186–197.

- Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Наркевич И. А. Разработка состава и технологии таблеток нового нейропротекторного средства с использованием дробного факторного эксперимента. *Разработки и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):18–22. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.
- Chernov N. M., Shutov R. V., Barygin O. I., Dron M. Y., Starova G. L., Kuz'mich N. N., Yakovlev I. P. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-Type reaction. *European Journal of Organic Chemistry*. 2018;45:6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.
- Приходько В. А., Сысоев Ю. И., Оковитый С. В. Возможность применения производных морфолина в качестве средств коррекции неврологических нарушений при заболеваниях нервной системы. *Формулы Фармации*. 2020;2(1):16–35. DOI: 10.17816/phf21381/2713-153X-2020-1-2-16-35.
- Sysoev Yu. I., Uzuogbunam B. C., Okovityi S. V. Attenuation of neurological deficit by a novel ethanolamine derivative in rats after brain trauma. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2019;11:53–63. DOI: 10.2147/JEP.S199464.
- Jolkkonen J., Puurunen K., Rantakömi S., Härkönen A., Haapalinna A., Sivenius S. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000;400(2–3):211–9. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00409-X.
- Walsh R. N., Cummins R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*. 1976;83(3):482–504. DOI: 10.1037/0033-2909.83.3.482.
- Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322–8. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
- Schallert T., Fleming S. M., Leasure J. L., Tillerson J. L., Bland S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):777–787. DOI: 10.1016/S0028-3908(00)00005-8.
- Schallert T., Woodlee M. T., Fleming S. M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury: Recovery of function. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 2002. 201–216 p.
- Приходько В. А., Никитенко А. А., Петров Д. В., Сысоев Ю. И., Оковитый С. В. Влияние нового производного аллилморфолина на поведение *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум». Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию фармацевтического факультета КемГМУ. 29 ноября 2019; Кемерово. Кемерово: КемГМУ; 2019. 416–419 с.
- Приходько В. А., Сысоев Ю. И., Оковитый С. В. Влияние нового производного аллилморфолина на поведение рыб *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум». Материалы международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы». 13 ноября 2020. Ташкент. 2020. 392–394 с.
- Приходько В. А., Кан А. В. Влияние производных аллилморфолина на поведение *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум». «Молодая фармация – потенциал будущего», XI всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием. Сборник материалов конференции. Т. 1. 15 марта – 23 апреля 2021. Санкт-Петербург: СПХФУ; 2021. 67–68 с.
- Сысоев Ю. И., Дагаев С. Г., Кубарская Л. Г., Гайкова О. Н., Узурбунам Б. Ч., Модисе К., Маквана Т. Л., Оковитый С. В. Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(1):62–77. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
- Sysoev Yu. I., Prihodko V. A., Chernyakov R. T., Idiyatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sciences*. 2021;11:981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
- Saatman K. E., Murai H., Bartus R. T., Smith D. H., Hayward N. J., Perri B. R., McIntosh T. K. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(8):3428–3433. DOI: 10.1073/pnas.93.8.3428.
- Shi J., Longo F. M., Massa S. M. A small molecule p75(NTR) ligand protects neurogenesis after traumatic brain injury. *Stem Cells*. 2013;31(11):2561–74. DOI: 10.1002/stem.1516.
- Lenci E., Calugi L., Trabocchi A. Occurrence of morpholine in central nervous system drug discovery. *ACS Chemical Neuroscience*. 2021;12(3):378–390. DOI: 10.1021/acscchemneuro.0c00729.
- Kouronakis A. P., Xanthopoulos D., Tzara A. Morpholine as a privileged structure: a review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Medicinal Research Reviews*. 2020;40(2):709–752. DOI: 10.1002/med.21634.
- Tzara A., Xanthopoulos D., Kouronakis A. P. Morpholine as a scaffold in Medicinal Chemistry: An update on synthetic strategies. *ChemMedChem*. 2020;15(5):392–403. DOI: 10.1002/cmdc.201900682.
- Kumari A., Singh R. K. Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). *Bioorganic Chemistry*. 2020;96:103578. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103578.

27. Washington J., Murcko R. M., Janigro D. Peripheral markers of TBI and blood-brain barrier disruption. In: Biomarkers for Traumatic Brain Injury. Cambridge, MA: Academic Press; 2020. 43–54 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-816346-7.00004-X.
28. Bracken M. B. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2009;102(3):120–122. DOI: 10.1258/jrsm.2008.08k033.

REFERENCES

1. Dewan M. C., Rattani A., Gupta S., Baticulon R. E., Hung Y.-C., Panchak M., Agrawal A., Adeleye A. O., Shrimo M. G., Rubiano A. M., Rosenfeld J. V., Park K. B. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*. 2018;1–18. DOI: 10.3171/2017.10.JNS17352.
2. Krylov V. V., Petrikov S. S., Talypov A. E., Puras Yu. V., Solodov A. A., Levchenko O. V., Grigoryeva E. V., Kordonskiy A. Yu. modern principles of surgery severe craniocerebral trauma. *Zhurnal im. N. V. Sklifosovskogo "Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch" = Russian Sklifosovskiy Journal "Emergency Medical Care"*. 2013;(4):39–47. (In Russ.)
3. Loane D. J., Stoica B. A., Faden A. I. Neuroprotection for traumatic brain injury. *Handbook of Clinical Neurology*. 2015;127:343–366. DOI: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00022-2.
4. Potapov A. A., Likhberman L. B., Kravchuk A. D., Okhlopov V. A., Aleksandrova E. V., Filatova M. M., Maryakhin A. D., Latyshev Ya. A. *Legkaya cherepno-mozgovaya travma: klinicheskie rekomendatsii* [Mild traumatic brain injury: Clinical guidelines]. Moscow: Assotsiatsiya neyrokhirurgov Rossii; 2016. 23 p. (In Russ.)
5. Potapov A. A., Krylov V. V., Gavrilov A. G., Kravchuk A. D., Likhberman L. B., Petrikov S. S., Talypov A. E., Zakharova N. E., Oshorov A. V., Sychev A. A., Aleksandrova E. V., Solodov A. A. Guidelines for the diagnosis and treatment of severe traumatic brain injury. Part 2. Intensive care and neuromonitoring. *Zhurnal «Voprosy neyrokhirurgii» imeni N.N. Burdenko = Burdenko's Journal of Neurosurgery*. 2016;80(1):98–106. (In Russ.) DOI: 10.17116/neiro201680198-10.
6. Tyurenkov I. N., Kurkin D. V., Litvinov A. A., Logvinova E. A., Morokovin E. I., Bakulin D. A., Volotova E. V. Acute stroke models used in preclinical research. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration*. 2018;(1):186–197. (In Russ.)
7. Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A. Development of the composition and technology of new neuroprotective drug tablets using fractional factorial design. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration*. 2020;9(1):18–22. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.
8. Chernov N. M., Shutov R. V., Barygin O. I., Dron M. Y., Starova G. L., Kuz'mich N. N., Yakovlev I. P. Synthesis of chromone-containing allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-Type reaction. *European Journal of Organic Chemistry*. 2018;45:6304–6313. DOI: 10.1002/ejoc.201801159.
9. Prikhodko V. A., Sysoev Yu. I., Okovityi S. V. Morpholine derivatives as potential agents for neurological manifestations of nervous system diseases. *Formuly Farmatsii = Pharmacy Formulas*. 2020;2(1):16–35. (In Russ.) DOI: 10.17816/phf21381/2713-153X-2020-1-2-16-35.
10. Sysoev Yu. I., Uzuogbunam B. C., Okovityi S. V. Attenuation of neurological deficit by a novel ethanolamine derivative in rats after brain trauma. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2019;11:53–63. DOI: 10.2147/JEP.S199464.
11. Jolkonen J., Puurunen K., Rantakömi S., Härkönen A., Haapalinna A., Sivenius S. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000;400(2–3):211–9. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00409-X.
12. Walsh R. N., Cummins R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*. 1976;83(3):482–504. DOI: 10.1037/0033-2909.83.3.482.
13. Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322–8. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
14. Schallert T., Fleming S. M., Leasure J. L., Tillerson J. L., Bland S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):777–787. DOI: 10.1016/S0028-3908(00)00005-8.
15. Schallert T., Woodlee M. T., Fleming S. M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury: Recovery of function. In: Pharmacology of Cerebral Ischemia. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 2002. 201–216 p.
16. Prikhodko V. A., Nikitenko A. A., Petrov D. V., Sysoev Yu. I., Okovityi S. V. *Vliyanie novogo proizvodnogo allilmorfolina na povedenie Danio rerio v teste «Novyy akvarium»*. Aktual'nye problemy i perspektivy farmatsevticheskoy nauki i praktiki: materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 40-letiyu farmatsevticheskogo fakul'teta KemGMU [Influence of a new derivative of allylmorpholine on the behavior of Danio rerio in the New Aquarium test Actual problems and prospects of pharmaceutical science and practice: materials of the International scientific-practical conference dedicated to the 40th anniversary of the pharmaceutical faculty of the KemSMU]. 2019 Nov 29. Kemerovo: KemGMU; 2019:416–419. (In Russ.)
17. Prikhodko V. A., Sysoev Yu. I., Okovityi S. V. *Vliyanie novogo proizvodnogo allilmorfolina na povedenie ryb Danio rerio v teste «Novyy akvarium»*. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Sovremennoe sostoyanie farmatsevticheskoy otstrasli: problemy i perspektivy» [Influence of a new derivative of allylmorpholine on the behavior of Danio rerio fish in the New Aquarium test. Materials of the international scientific and practical conference "The current state of the pharmaceutical industry: problems and prospects"]. 2020 Nov 13. Toshkent. 2020. 392–394 p. (In Russ.)
18. Prikhodko V. A., Kan A. V. *Vliyanie proizvodnykh allilmorfolina na povedenie Danio rerio v teste «Novyy akvarium»*. «Molodaya farmatsiya – potentsial budushchego», XI vserossiyskaya nauchnaya konferentsiya studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiem. *Sbornik materialov konferentsii* [The effect of allylmorpholine derivatives on the behavior of Danio rerio in the New Aquarium test. "Young Pharmacy – the Potential of the Future", XI All-Russian Scientific Conference of Students and Postgraduates with International Participation. Collection of conference materials]. V. 1. March 15 - April 23, 2021. Petersburg: SPKHFU; 2021. 67–68 p. (In Russ.)
19. Sysoev Yu. I., Dagaev S. G., Kubarskaja L. G., Gaikova O. N., Uzuogbunam B. Ch., Modise K., Makwana T. L., Okovityi S. V. Study of the neuroprotective activity of mafedine, an alpha-2 adrenergic receptor agonist, by modeling a traumatic brain injury in rats. *Biomeditsina = Journal Biomed*. 2019;(1):62–77. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
20. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Chernyakov R. T., Idiyatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sciences*. 2021;11:981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
21. Saatman K. E., Murai H., Bartsch R. T., Smith D. H., Hayward N. J., Perri B. R., McIntosh T. K. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(8):3428–3433. DOI: 10.1073/pnas.93.8.3428.
22. Shi J., Longo F. M., Massa S. M. A small molecule p75(NTR) ligand protects neurogenesis after traumatic brain injury. *Stem Cells*. 2013;31(11):2561–74. DOI: 10.1002/stem.1516.
23. Lenci E., Calugi L., Trabocchi A. Occurrence of morpholine in central nervous system drug discovery. *ACS Chemical Neuroscience*. 2021;12(3):378–390. DOI: 10.1021/acschemneuro.0c00729.
24. Kouronakis A. P., Xanthopoulos D., Tzara A. Morpholine as a privileged structure: a review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Medicinal Research Reviews*. 2020;40(2):709–752. DOI: 10.1002/med.21634.
25. Tzara A., Xanthopoulos D., Kouronakis A. P. Morpholine as a scaffold in Medicinal Chemistry: An update on synthetic strategies. *ChemMedChem*. 2020;15(5):392–403. DOI: 10.1002/cmdc.201900682.
26. Kumari A., Singh R. K. Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). *Bioorganic Chemistry*. 2020;96:103578. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103578.
27. Washington J., Murcko R. M., Janigro D. Peripheral markers of TBI and blood-brain barrier disruption. In: Biomarkers for Traumatic Brain Injury. Cambridge, MA: Academic Press; 2020. 43–54 p. DOI: 10.1016/B978-0-12-816346-7.00004-X.
28. Bracken M. B. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2009;102(3):120–122. DOI: 10.1258/jrsm.2008.08k033.