

На правах рукописи

Филина Инга Сергеевна

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ И ИММУНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА
ФЕНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГАМК И ГЛУТАМИНОВОЙ
КИСЛОТЫ ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ
ИЗМЕНЕННОГО ИММУНИТЕТА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ВОЛГОГРАД - 2016

Работа выполнена на кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

Научный руководитель:

Тюренков Иван Николаевич
член-корреспондент РАН, доктор
медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Мирзоян Рубен Симонович
заслуженный деятель науки РФ, доктор
медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией фармакологии
цереброваскулярных расстройств ФГБУ
«НИИ фармакологии имени В.В.
Закусова» РАН

Покровская Татьяна Григорьевна
доктор медицинских наук, профессор
кафедры фармакологии медицинского
института Белгородского
государственного национального
исследовательского университета

Ведущая организация:

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «___» июня 2016 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

В Российской Федерации, как и во всем мире, острые нарушения мозгового кровообращения являются одной из важнейших медико-социальных проблем, что обусловлено их высокой долей в структуре заболеваемости, а также большими показателями инвалидизации и смертности населения (Воробьев П.А., 2010; Sacco R.L., 2007). В России частота инсультов составляет в среднем 350-400 случаев на 100 тыс. населения (Воробьев П.А., 2010). На долю ишемического инсульта в нашей стране, как и в большинстве стран мира, приходится около 80% всех случаев инсульта (Гусев Е.И., 2006, 2014).

В острой стадии инсульта смертность составляет около 35%, увеличиваясь еще на 15% к концу первого года (Суслина З.А., 2009). Инвалидизация после перенесенного инсульта занимает первое место среди всех причин первичной инвалидности. Социально-экономическая значимость этого заболевания обусловлена также тем, что среди перенесших инсульт 1/3 – люди трудоспособного возраста, а к труду возвращается не более 20 % больных.

Известно, что гибель нервной ткани и формирование инфаркта при остром нарушении мозгового кровообращения являются результатом каскада патобиохимических и патофизиологических процессов (Гусев Е.И., 2003). Патогенез мозговой ишемии включает большое количество факторов, таких как гипоксия, глутаматная эксайтотоксичность, а также реакции воспаления, которые, в свою очередь, имея динамический характер, сопровождаются вовлечением различных механизмов про- и противовоспалительного характера на разных стадиях ишемического каскада и играют неоднозначную роль (Гусев Е.И., 1999).

Ишемический инсульт сопровождается нарушением нейроиммунного гомеостаза мозга, центральной регуляции функций иммунной системы (Кульчиков А.Е., 2012; Iadecola C., 2011) и приводит к инициации воспалительных процессов, как в центральной нервной системе, так и на периферии (Liesz A., 2009), к нарушениям в системном и региональном иммунном ответе, а в дальнейшем к развитию иммунодефицита (Fann D.Y., 2013), проявляющегося депрессией клеточного и неспецифического звена иммунитета (Субботина Н.С., 2012; Кульчиков А.Е., 2011; Сергеева С. П., 2010; Chamorro A., 2012; Klehmet J., 2009; Vogelgesang A., 2008). В ответ на повреждение нервной ткани происходит активация гуморального звена иммунитета, что может привести к аутоиммунным осложнениям (Кульчиков А.Е., 2011). Неконтролируемая активизация воспалительных процессов во время острой гипоксии мозга способствует расширению площади его некроза (Жданов Г.Н., 2006). Дисбаланс цитокинов в сторону увеличения провоспалительного потенциала и локальная воспалительная реакция в ответ на действие повреждающего фактора приводит к повреждению нейронов, гематоэнцефалического барьера и нарушениям микроциркуляции (Харченко Е.П., 2007; Lafon M., 2006).

По-видимому, иммунная система может выполнять двойственную роль в патогенезе острых нарушений мозгового кровообращения. В острой фазе активизируются иммунные механизмы, приводящие к иммунному воспалению, но в дальнейшем, как компенсаторный механизм, развивается иммуносупрессия. С одной стороны, иммуносупрессия может выполнять протекторную роль, ограничивая постишемическую активацию резидентных и привлекаемых из периферии провоспалительных клеток, таких как микроглия и Т-лимфоциты (Liesz A., 2009), а с другой стороны в результате снижения пролиферативной и функциональной активности клеток-эффекторов, иммуносупрессия в целом может приводить к увеличению восприимчивости организма больных к тяжелым инфекциям (Субботина Н.С., 2012; Offner H., 2009; Sacco R. L., 2007), торможению процессов репарации в стадии разрешения воспаления (De Raedt S., 2015).

Степень разработанности проблемы.

За последние годы были проведены многочисленные исследования, посвященные изучению нейроиммунного взаимодействия при различных патологических состояниях (Самотруева М.А., 2012; Борщикова Т.И., 2011; Гаврилов Ю.В., 2009; Рыбакина Е.Г., 2009; Калинина Н.М., 2005; Арушанян Э.Б., 2004; Chamorro A., 2012; Liesz A., 2009), в том числе и при сосудистых заболеваниях головного мозга (Охтова Ф.Р., 2014; Кладова Е.А., 2010; Жданов Г.Н., 2007; Ребенко Н.М., 2005; Гусев Е.И., 1999; Chamorro A., 2006), а также путей их фармакологической коррекции (Громова О.А., 2014; Кульчиков А.Е., 2012; Чуралева О.В., 2006; Hallenbeck J., 2006). В литературе имеется огромное количество экспериментальных и клинических данных, доказывающих изменение иммунного статуса организма, связанного с ишемическим инсультом (Субботина Н.С., 2012; Сергеева С. П., 2009; Кашаева Л.Н., 2005; De Raedt S., 2015; Chamorro A., 2012; Iadecola C., 2011; Klehmet J., 2009; Liesz A., 2009; Offner H., 2009; Vogelgesang A., 2008; Dirnagl U., 2007; Huang J., 2006; Meisel C., 2005), в которых была показана значимая роль иммунной системы в течение и исходе данной патологии. Однако вопрос о роли состояния иммунной системы в течении острых нарушений мозгового кровообращения и в обеспечении терапевтического действия применяемых лекарственных средств является малоизученным.

Цель исследования.

Целью настоящей работы является экспериментальное обоснование возможного дифференцированного применения фенильных производных ГАМК и глутаминовой кислоты при ишемическом повреждении головного мозга в условиях различного состояния иммунной системы.

Задачи исследования.

1. Изучить иммуотропные свойства производных ГАМК и глутаминовой кислоты при однократном и курсовом их применении, оценив влияние веществ на гуморальное и клеточное звено первичного иммунного ответа на антиген, а также на фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов.

2. Изучить психотропное действие производных ГАМК и глутаминовой кислоты в условиях развития первичного иммунного ответа на антиген при курсовом введении веществ.

3. Исследовать влияние подавленного и стимулированного иммунитета животных на течение и исход ишемического повреждения головного мозга у крыс после необратимой окклюзии сонных артерий.

4. Оценить влияние фенибута, нейроглутама и препарата сравнения церебролизина на течение и исход ишемии головного мозга в условиях измененной иммунореактивности: гибель животных, степень выраженности неврологического дефицита, показатели сенсомоторной, двигательной и исследовательской активности.

5. Исследовать уровень мозгового кровотока, степень постишемического отека головного мозга, содержание в сыворотке крови маркеров повреждения структур головного мозга – NSE, MBP и уровень нейротрофина BDNF у крыс в условиях неизменной, подавленной и стимулированной иммунной системы при введении исследуемых веществ после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

6. Выявить изменения уровней про- (IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных цитокинов (IL-4) в сыворотке крови, массы тимуса и селезенки у животных с ишемией головного мозга в условиях неизменной, подавленной и стимулированной иммунной системы.

7. Оценить влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на иммунную систему животных с ишемией головного мозга, изучив при этом уровень сывороточной концентрации интерлейкинов IL-1 β , IL-6 и IL-4, массы тимуса и селезенки, содержание лейкоцитов и их субпопуляций в периферической крови в условиях измененного иммунитета.

Новизна исследования.

Впервые изучено психотропное действие фенильных производных ГАМК и глутаминовой кислоты в условиях развития первичного иммунного ответа на антиген при курсовом введении веществ.

Впервые выполнено сравнительное изучение церебропротекторного и иммунокорригирующего действия фенибута, нейроглутама и препарата сравнения церебролизина на модели нарушения мозгового кровообращения ишемического генеза в условиях измененного иммунитета животных и установлено их неравнозначное нейропротекторное действие при различном фоновом состоянии иммунной системы. Так, установлено, что фенибут оказывает выраженное церебропротекторное действие при ишемическом повреждении головного мозга в условиях стимулированной иммунной системы, церебролизин – при неизменном и подавленном иммунитете, а нейроглутам был эффективен независимо от иммунореактивности животных.

Научно-практическая ценность работы.

В ходе диссертационного исследования проведена сравнительная оценка церебропротекторного и иммунокорригирующего действия фенильных производных ГАМК и глутаминовой кислоты – фенибута и нейроглутама, а также препарата сравнения церебролизина в условиях

неизменной, подавленной и стимулированной иммунной системы животных. Полученные результаты по активности указанных веществ обосновывают целесообразность применения при острых нарушениях мозгового кровообращения средств, обладающих помимо нейропротекторного действия и иммунокорригирующими свойствами. Отмечена зависимость терапевтического эффекта исследуемых веществ от фонового состояния иммунной системы животных. Так, нейроглутам оказал выраженное нейропротекторное действие при инсульте независимо от иммунного статуса, терапевтический эффект при применении фенибута был более выражен при стимулированном иммунитете, а препарат церебролизин оказывал максимальный терапевтический эффект при неизменном и подавленном иммунитете. Таким образом, результаты представленного исследования указывают о влиянии состояния иммунной системы на течение и последствия острого нарушения мозгового кровообращения; на неоднозначность терапевтического действия исследуемых веществ в зависимости от состояния иммунитета. При поиске и разработке лекарственных средств, предназначенных для лечения острых нарушений мозгового кровообращения, необходимо учитывать коморбидный фон иммунной системы экспериментальных животных.

Реализация результатов.

Результаты проведенного исследования включены в материалы лекций и практических занятий для студентов на кафедре фармакологии ВолгГМУ, Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ и для интернов и слушателей-провизоров, проходящих последипломное усовершенствование на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ. Полученные данные о неоднозначном церебропротекторном действии исследуемых веществ при ишемии головного мозга в условиях измененного иммунитета принято учитывать в научно-исследовательской работе кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ при изучении влияния веществ на мозговой кровоток в условиях нормы и экспериментальной патологии. Часть диссертации выполнена в рамках доклинических исследований нового психотропного средства, разрабатываемого по государственному контракту с Минпромторгом РФ № 11411.18700.13.089 от 13.09.2011 на выполнение научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы (НИОКР) «Доклинические исследования антидепрессантного, анксиолитического и нейропротекторного лекарственного средства на основе глутаминовой кислоты» Шифр «2.1 Нейро глутамин 2011».

Методология и методы исследования.

В исследовании использован комплексный подход к изучению нейропротекторного и иммунотропного влияния веществ на животных с ишемическим повреждением головного мозга, моделированным необратимой поэтапной перевязкой общих сонных артерий с 3-х суточным интервалом в

условиях измененного состояния их иммунной системы. В качестве объектов исследования выступали крысы-самцы линии Wistar массой 210-250 г 5-6 мес. возраста. Изучение влияния фенильных производных ГАМК и глутаминовой кислоты, а также препарата сравнения церебролизина на нервную и иммунную системы животных, перенесших ишемическое поражение головного мозга в условиях измененной иммунореактивности проводилось с использованием методических рекомендаций по доклиническому изучению лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012) и с применением рекомендованных методов статистической обработки данных (Реброва О.Ю. 2006; Гланц С., 1999).

Положения, выносимые на защиту.

1. Фенильное производное ГАМК-фенибут и фенильное производное глутаминовой кислоты – нейроглютам обладают выраженными иммуностропными свойствами, влияя на показатели гуморального, клеточного звена иммунного ответа на антигенный стимул и фагоцитарные показатели полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови.

2. Психокоррегирующее действие фенибута и нейроглутама заключается в нивелировании признаков тревожности, повышении двигательной и исследовательской активности животных в условиях развития иммунного ответа на иммунизацию антигеном.

3. Ишемия головного мозга у животных на фоне подавленного иммунитета протекает тяжелее и с худшим клиническим исходом, по сравнению с нарушением мозгового кровообращения в условиях стимулированной иммунной системы, что проявляется в большей летальности животных, развитии более тяжелого неврологического дефицита, снижении мышечной силы, двигательной и ориентировочно-исследовательской активности. В сыворотке крови у животных в условиях иммуносупрессии при ишемическом поражении головного мозга более значимо увеличено содержание нейронспецифических белков NSE и MBP. При стимулированной иммунной системе все проявления ишемического повреждения головного мозга выражены в меньшей степени.

4. Фоновое состояние иммунной системы в значительной мере влияет на эффективность нейропротекторного действия исследуемых веществ. Так если фенильное производное глутаминовой кислоты – нейроглютам при введении в течение 7-ми дней после окклюзии общих сонных артерий оказывает сопоставимое церебропротекторное действие в условиях ишемии головного мозга, как при неизменном иммунитете животных, так и на фоне измененной иммунореактивности, то фенильное производное ГАМК – фенибут оказывает наибольший нейропротекторный эффект при ишемии головного мозга на фоне стимулированной иммунной системы и в меньшей степени – при иммуносупрессии. Препарат церебролизин оказался более эффективен в лечении инсульта в условиях неизменного и подавленного иммунитета животных.

6. Одним из возможных механизмов нейропротекторного действия фенибута, нейроглутама и церебролизина при ишемии головного мозга,

являются их иммунокорригирующие свойства, которые проявляются во влиянии на уровень провоспалительных (IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных цитокинов (IL-4), массы тимуса и селезенки, общее количество лейкоцитов и их субпопуляций.

Личный вклад.

Автор принимал участие в формулировке задач, выводов и научно-практических рекомендаций. При его участии проведен подбор методов исследования, разработаны протоколы экспериментов, дизайн исследования. Автором самостоятельно обобщены и проанализированы данные литературы по проблеме, выполнена экспериментальная часть работы, проведены статистическая обработка и описание результатов исследования.

Степень достоверности и апробации результатов.

Достоверность результатов исследования подтверждается значительным объемом экспериментальных данных, применением современного, высокотехнологичного оборудования, адекватных общепринятых методов и критериев статистической обработки данных. Материалы работы докладывались и обсуждались на IV Всероссийском научно-практическом семинаре молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» (Волгоград, 2012); 71-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2013); Объединенном иммунологическом форуме-2013 (Нижний Новгород, 2013); V Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2013» (Санкт-Петербург, 2013, диплом I степени); 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2015). По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 5 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы, включающего 241 источник, из них 99 отечественных и 142 зарубежных авторов. Работа проиллюстрирована 10 таблицами, 14 рисунками и 2 схемами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе приведены данные исследований отечественных и зарубежных авторов о вкладе иммунологических механизмов в патогенез ОНМК. Показано, что патогенез ИГМ включает большое количество факторов, из которых далеко не последнюю роль играют реакции воспаления. Ишемический инсульт сопровождается нарушением нейроиммунного гомеостаза мозга, центральной регуляции функций ИС и

приводит к инициации воспалительных процессов, как в ЦНС, так и на периферии, к нарушениям в системном и региональном иммунном ответе, к активации гуморального звена, а в дальнейшем к развитию иммунодефицита, проявляющегося депрессией клеточного и неспецифического звена иммунитета. Степень иммунных нарушений, во многом определяющая характер и исход инсульта, может быть откорректирована в результате использования препаратов для лечения, которые обладают помимо нейропротекторной активности и иммунокорригирующим действием. Показано, что производные ГАМК и глутаминовой кислоты обладают нейропротекторной и эндотелиопротекторной активностью; иммунокорригирующими свойствами; ноотропными эффектами; антиоксидантным, противогипоксическим, антитромботическим и психотропным действием, что позволяет считать перспективным поиск среди них веществ, способных оказывать терапевтическое действие при ОНМК ишемического типа.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. Эксперименты проводились в 2 блока. Первый блок был выполнен на 430 мышах-самцах линии Balb/c массой 20-24 г 4-5 мес. возраста (изучение иммуностропной активности исследуемых веществ и их психотропной активности при развитии первичного иммунного ответа на антиген; однократное и 14-ти дневное внутрибрюшинное введение). Второй блок экспериментов был выполнен на 480 крысах-самцах линии Wistar массой 210-250 г 5-6 мес. возраста (изучение нейропротекторного и иммунокорригирующего действия исследуемых веществ при ИГМ в условиях измененного состояния ИС животных; внутрибрюшинное введение в течение 3-х и 7-ми дней после ишемии).

Лабораторные животные получены из питомников «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН (Московская обл.) и ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл.). Содержание и уход за ними осуществлялся согласно рекомендациям ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (The European Convention, 1986). Экспериментальная часть работы выполнена в соответствии с заключением этической экспертизы: протокол № 156-2012 от 6 апреля 2012 года.

В работе изучались глутаминовая кислота, β -фенильное производное глутаминовой кислоты - нейроглутам, фенильное производное ГАМК - фенибут. Вещества синтезированы на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета имени А.Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия) под руководством профессора В. М.

Берестовицкой¹. В качестве препарата позитивного контроля был использован церебролизин, который применялся в виде раствора (церебролизин раствор для инъекций 215,2 мг/мл, EVER Neuro Pharma GmbH, Австрия).

В каждом блоке исследований формировалась контрольная и интактная группы животных. Все исследуемые вещества и соединения растворяли в физиологическом растворе ex tempore таким образом, что 0,1 мл раствора содержал исследуемую дозу на 100 г веса животного.

Использовались наиболее эффективные дозы исследуемых соединений, выявленные при изучении нейропротекторной, эндотелиопротекторной, иммуностропной и психотропной активности (Епишина В.В., 2006; Бородкина Л.Е., 2009; Меркушенкова О.В., 2009; Воронков А.В., 2011; Самотруева М.А., 2012; Кривицкая А.Н., 2012; Куркин Д.В., 2013). Препарат позитивного контроля церебролизин применялся в эффективной дозе по данным литературы (Кульчиков А.Е., 2012).

При изучении иммуностропной активности исследуемых веществ применяли однократное и 14-ти дневное внутрибрюшинное их введение, при этом оценивали функциональное состояние ИС животных на основании РПГА с определением титра антител, РГЗТ с определением индекса воспаления реакции, латексного теста по изучению показателей фагоцитоза нейтрофилов периферической крови (Миронов А.Н., 2012; Самотруева М.А., 2012; Назаренко Г.И., 2007).

Для оценки особенностей поведения животных в условиях развития первичного иммунного ответа на антиген, при введении исследуемых веществ в течение 14-ти дней внутрибрюшинно, использовали психофармакологические тесты в стандартной модификации: ОП (Воронина Т. А., 2012) и ЧБК (Амикишиева А.В., 2009; Воронина Т.А., 2000).

Для воспроизведения НМК была выбрана модель поэтапной перевязки ОСА с интервалом в 3-е суток между окклюзией левой и правой сонной артерии, при которой снижается уровень летальности оперированных животных, что позволяет оценить динамику восстановительного периода (Фатеев И.В., 2011).

Учитывая важную и неоднозначную роль ИС в развитии ИГМ, при моделировании НМК была выполнена фоновая супрессия и стимуляция ИС животных. Для подавления иммунитета использовали селективный иммунодепрессант – вещество циклоспорин (торговое название «Экорал», IVAX Pharmaceuticals, Чешская Республика) в дозе 5 мг/кг (Zijlstra G.S., 2009). Циклоспорин вводили перорально ежедневно в первой половине дня на протяжении всего эксперимента кратностью 9 или 13 раз при лечении ИГМ исследуемыми веществами в течение 3-х или 7-ми дней

¹ Выражаем искреннюю благодарность зав. кафедрой органической химии РГПУ им. А. И. Герцена, з.д.н., д.х.н., проф. В.М. Берестовицкой; к.х.н., доц. О.С. Васильевой и всем сотрудникам кафедры за предоставленные для исследования вещества.

соответственно. Для создания фоновой активности ИС животных применяли иммуностимулирующее средство «Пирогенал» (Медгамал, филиал ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия), представляющее собой ЛПС. Была применена доза ЛПС 10 мкг/кг (Гриневиц В.В., 2003) с частотой внутрибрюшинного введения через день в первой половине дня на протяжении всего эксперимента кратностью 5 или 7 раз при лечении ИГМ исследуемыми веществами в течение 3-х или 7-ми дней соответственно. Введение циклоспорина и ЛПС начинали за сутки до перевязки первой ОСА. При изучении лимфопролиферативных процессов в иммунокомпетентных органах определяли массу тимуса и селезенки, выражая данные в процентах относительно веса животного.

После моделирования ИГМ проводилась оценка выживаемости животных, неврологического дефицита по шкале McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной (Ганнушкина, И. В., 1996).

После НМК в тесте ОП оценивали ДА и ОИА (Воронина Т. А., 2012). Для оценки координации движений и мышечной силы животных использовали Rota-Rod тест, в котором регистрировали ЛП первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки (Bohlen M., 2009).

Оценку уровня МК животных проводили с помощью ультразвуковой флоуметрии на доплерографе «Минимакс-Доплер-К» (ООО «СП-Минимакс», г. Санкт-Петербург).

Выраженность постишемического отека головного мозга оценивали по степени гидратации мозговой ткани (Vakili A., 2011).

Для оценки степени поражения нервной ткани при ишемическом ее повреждении были определены уровни нейронспецифической енолазы (NSE) (Чуканова Е.И., 2014; Гришанова Т.Г., 2011) и основного белка миелина (МВР) (Чуканова Е.И., 2014; Чехонин В.П., 2000) как маркеров повреждения дифференцированных нейронов и глии ГМ соответственно. Так как, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) является основным нейротрофином, который стимулирует рост аксонов и ветвление дендритов, участвует в неоангиогенезе и антиоксидантной защите (Podratz J.L., 2005), обладает антиапоптозной защитой (Chen B., 2009), снижает провоспалительную реакцию глии (Sondag C.M., 2009), то данный фактор также был исследован в настоящей работе.

ОНМК сопровождаются воспалением тканей ГМ, что в значительной мере сопряжено с включением в процесс цитокинового пула и, в частности, про- и противовоспалительных интерлейкинов, от соотношения активности которых может зависеть течение и исход НМК (Никифорова Т.А., 2014; Сковцова В.И., 2003; Tuttolomondo A., 2008; Wang Q., 2007), поэтому в данной работе были исследованы уровни основных про- (IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-4) цитокинов.

Определение концентрации белков и цитокинов осуществляли в сыворотке крови методом твердофазного ИФА с использованием наборов фирмы «Cusabio-Rat» (Китай) на ИФА-комплексе фирмы Tecan (Австрия).

Обработка полученных данных проводилась с помощью пакетов программ MS Excel (Microsoft, США), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., США) и Statistica 8.0 (StatSoft, США). Статистическая обработка результатов экспериментов в зависимости от характера данных проводилась с использованием параметрических и непараметрических критериев: *t* критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони; критерий Фишера; критерий хи-квадрат; ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса с пост-хок тестами Ньюмена-Кейлса и Данна для множественных сравнений. Проверка данных на нормальность распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Статистически значимыми признавались различия при уровне $p \leq 0,05$ (Реброва О.Ю., 2006; Гланц С., 1999).

В третьей главе представлены результаты изучения иммуотропной активности производных ГАМК и глутаминовой кислоты при однократном и 14-ти дневном внутрибрюшинном введении веществ, а также оценка их психотропной активности в условиях развития иммунного ответа на антиген при курсовом применении.

При первичной оценке иммуотропных эффектов исследуемых веществ выявлено, что фенибут (25 мг/кг) и нейроглутам (26, 78 мг/кг) стимулировали гуморальный иммунный ответ, как при однократном, так и при курсовом введении. При оценке влияния на Т-клеточный иммунитет фенибут и нейроглутам в данных дозах повышали индекс воспаления в РГЗТ при однократном применении, а при 14-ти дневном - фенибут повышал Т-клеточный иммунитет, а нейроглутам значимо его снижал (таблица 1).

Таблица 1. Титр антител в РПГА и индекс воспаления в РГЗТ при однократном и 14-ти дневном внутрибрюшинном введении исследуемых веществ ($M \pm m$)

Группы		Титр антител в РПГА, lg		Индекс воспаления в РГЗТ, %	
Кратность введения		Однократное	14-ти дневное	Однократное	14-ти дневное
Контроль		1,77 $\pm$ 0,22	1,54 $\pm$ 0,20	12,4 $\pm$ 0,76	21,7 $\pm$ 1,99
Фенибут 25 мг/кг		2,44$\pm$0,12 *	2,24$\pm$0,15 *	18,1$\pm$1,25 *	25,6$\pm$0,93 *
ГК 200 мг/кг		1,93 $\pm$ 0,10	2,32$\pm$0,11 *	14,3 $\pm$ 1,16	17,3 $\pm$ 1,54
Нейроглутам	26 мг/кг	2,54$\pm$0,13 *	2,57$\pm$0,14 *	20,9$\pm$1,05 *	16,4$\pm$1,53 *
	78 мг/кг	2,48$\pm$0,11 *	2,55$\pm$0,10 *	17,6$\pm$1,33 *	19,6 $\pm$ 1,03
	234 мг/кг	1,85 $\pm$ 0,23	-	11,6 $\pm$ 1,01	-

Обозначения: ГК – глутаминовая кислота. Различия достоверны при $p \leq 0,05$: * - по сравнению с животными группы Контроль.

Оценка влияния веществ на неспецифический иммунный ответ показала, что фенибут (25 мг/кг) и нейроглутам (26, 78 мг/кг) увеличивают процент активных нейтрофилов и поглощенные ими объекты фагоцитоза (таблица 2).

У животных контрольной группы при развитии иммунного ответа на введение антигена отмечены изменения психоэмоционального статуса, зарегистрированные в тестах ОП и ЧБК относительно показателей интактной группы. Так, у животных группы контроль снизились локомоторная и исследовательская активности поведения (таблица 3).

Таблица 2. Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови при 14-ти дневном внутрибрюшинном введении исследуемых веществ ($M \pm m$)

Группы		Фагоцитарный показатель (%)	Фагоцитарное число (количество)
Контроль		33,8±4,0	2,7±0,2
Фенибут 25 мг/кг		62,1±2,1 *	3,5±0,2 *
Глутаминовая кислота 200 мг/кг		45,0±2,2 *	3,1±0,2
Нейроглютам	26 мг/кг	72,1±3,8 *	3,4±0,1 *
	78 мг/кг	57,2±2,5 *	3,3±0,1 *

Обозначения: фагоцитарный показатель - процент активных нейтрофилов; фагоцитарное число – количество поглощенных объектов фагоцитоза. Различия достоверны при $p \leq 0,05$: * - по сравнению с животными группы Контроль.

Таблица 3. Влияние исследуемых веществ на поведение животных в тестах «Открытое поле» и «Черно-белая камера» после 14-ти дневного введения (до иммунизации) и на 3-ий день развития иммунного ответа на антигенный стимул (после иммунизации) ($M \pm m$)

Группы	Интакт	Контроль	Фенибут	ГК	Нейроглютам	
Показатель	физ. раствор		25 мг/кг	200 мг/кг	26 мг/кг	78 мг/кг
ОП, показатели активности поведения						
ДА «1»	40±3,5	38±4,4	59±4,5 *	65±4,9 *	63±4,5 *	57±4,5 *
ДА «2»	30±3,4	19±3,1 #	47±4,0 *	49±4,2 *	46±4,9 *	37±4,4 *
ОИА «1»	16±1,6	13±1,3	14±1,1	22±1,3 *	19±1,7 *	18±1,4 *
ОИА «2»	10±1,9	4±0,4 #	6±0,8 *	10±1,6 *	13±2,0 *	12±1,7 *
ЧБК, показатели активности поведения						
Переходы «1»	2,8±0,63	2,5±0,43	3,5±0,45	4,9±0,67 *	4,9±0,66 *	4,4±0,61 *
Переходы «2»	2,8±0,35	0,9±0,23 #	3,1±0,37 *	2,2±0,39 *	3,3±0,46 *	3,4±0,65 *
Стойки «1»	1,7±0,33	1,9±0,23	2,6±0,24 *	4,5±0,84 *	3,1±0,33 *	2,1±0,23
Стойки «2»	1,5±0,29	0,8±0,20 #	1,9±0,21 *	1,7±0,30 *	2,4±0,31 *	2,0±0,28 *
ОП, показатели тревоги						
Центр «1»	1,4±0,20	1,4±0,26	1,1±0,28	2,8±0,26 *	1,5±0,25	1,6±0,29
Центр «2»	1,3±0,25	0,6±0,21 #	1,7±0,27 *	1,6±0,15 *	1,5±0,28 *	0,9±0,25
Болюсы «1»	0,5±0,21	0,8±0,28	0,5±0,16	0,6±0,28	0,5±0,21	0,6±0,23
Болюсы «2»	0,8±0,29	2,1±0,18 #	1,3±0,30 *	1,7±0,27	1,3±0,30 *	1,5±0,28
Грумминг «1»	1,6±0,34	1,8±0,20	1,4±0,24	2,3±0,33	1,3±0,25	1,5±0,22
Грумминг «2»	1,4±0,22	2,7±0,28 #	1,5±0,21 *	2,4±0,28	1,3±0,28 *	1,7±0,27 *
ЧБК, показатели тревоги						
ЛП (сек) «1»	80±19,5	82±15,8	114±19,7	46±14,2	144±20,7 *	99±23,3 *
ЛП (сек) «2»	77±14,1	41±11,3 #	79±12,4 *	52±12,4	92±14,5	61±15,8
Время (сек) «1»	123±22,9	129±13,8	173±18,2	115±12,7	167±15,1	118±29,2
Время (сек) «2»	119±17,9	57±16,3 #	106±13,6 *	71±13,4	112±14,5 *	87±11,1

Обозначения: «1» - до иммунизации животных; «2» - после иммунизации животных; ГК – глутаминовая кислота; ДА – двигательная активность; ОИА – ориентировочно-исследовательская активность; Переходы – количество переходов между отсеками; Стойки – число исследовательских стоек; Центр – количество заходов в центр; Болюсы – количество фекальных болюсов; Грумминг – число актов кратковременного грумминга; ЛП – латентный период (время до первого захода в темный отсек); Время – суммарное время, проведенное в светлом отсеке. Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению группой животных Интакт; * - по сравнению с группой животных Контроль.

Фенибут (25 мг/кг) и нейроглютам (26, 78 мг/кг) достоверно увеличивали ДА в ОП и количество переходов между отсеками в ЧБК, их применение способствовало увеличению ОИА в тесте ОП и количества исследовательских стоек в тесте ЧБК (таблица 3).

На фоне развития иммунного ответа отмечалось присоединение тревожного компонента к поведению животных контрольной группы. Фенибут (25 мг/кг) и нейроглютам (26 мг/кг) снижали число актов кратковременного груминга и количество фекальных болюсов в тесте ОП, увеличивали ЛП первого захода в темный отсек и суммарное время, проведенное в светлом отсеке в тесте ЧБК (таблица 3).

Так как фенильное производное ГАМК-фенибут в дозе 25 мг/кг и фенильное производное глутаминовой кислоты – нейроглютам в дозе 26 мг/кг оказали выраженное иммуностропное и психокорректирующее действие, то для дальнейшего изучения их терапевтического потенциала было проведено изучение нейропротекторного действия данных веществ при ишемическом поражении ГМ в условиях измененной реактивности ИС. В качестве препарата сравнения использовали церебролизин.

В четвертой главе изложены результаты изучения влияния состояния ИС на последствия ишемического поражения ГМ у животных и церебропротекторного действия исследуемых веществ при ИГМ в условиях неизмененного и измененного состояния ИС животных. Использовали терапевтическое введение веществ в течение 3-х и 7-ми дней после моделирования ИГМ. Нейроглютам, фенибут и церебролизин применялись в дозах 26, 25 мг/кг и 2,5 мл/кг соответственно.

При моделировании окклюзии ОСА максимальная гибель животных и тяжелый неврологический дефицит у крыс группы контроль-ишемия наблюдался в условиях подавления ИС (таблица 4).

Во всех группах животных с церебральной ишемией, получавших в течение 7 дней терапию исследуемыми веществами показатель смертности и балл неврологического дефицита был меньше, чем в группе контроль-ишемия. При применении нейроглутама смертность и неврологические нарушения были одинаково низкими при всех состояниях ИС. При введении фенибута - на фоне стимулированной ИС, церебролизина - в условиях неизмененного и подавленного иммунитета (таблица 4).

О степени ишемического повреждения ГМ, его функциональном состоянии после окклюзии ОСА можно судить по изменению координации движений, мышечной силы животных. Поэтому на 7-й день после моделирования ИГМ в тесте Rota-Rod фиксировали ЛП первого падения и суммарное время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки. Максимальное нарушение координации движений и снижение мышечной силы зарегистрированы в группе контроль-ишемия в условиях иммуносупрессии (таблица 5).

Применение нейроглутама способствовало сохранению у ишемизированных животных высокой координации движений и мышечной силы вне зависимости от фонового состояния ИС, фенибута - при

стимулированном иммунитете, церебролизина – при неизменной и подавленной ИС (таблица 5).

Повреждение головного мозга при ишемии приводит к нарушению в поведении животных, поэтому через 7 дней после перевязки ОСА оценивали ДА и ОИА в тесте ОП. Наименьшие показатели в группе контроль-ишемия зафиксированы в условиях иммуносупрессии. Повышение данных показателей относительно группы контроль-ишемия, свидетельствуют о меньшем повреждении ЦНС (таблица 5).

Таблица 4. Летальность и неврологический дефицит животных по шкале McGrow после поэтапной необратимой окклюзии ОСА

Состояние ИС	Группы	N	Летальность животных, %		Неврологический дефицит, (баллы, M±m)	
			Время после поэтапной окклюзии общих сонных артерий			
			72 часа	7 суток	72 часа	7 суток
Неизменная ИС	ЛО	15	0	0	0,1±0,05	0,03±0,03
	ИГМ	20	35#	55#	4,65±0,91 #	6,08±1,0 #
	ИГМ+НГ	15	6,6 ∞	20 ∞	1,83±0,6 *	2,2±1,05 *
	ИГМ+ФТ	15	13,3 ∞	33,3	2,53±0,8	3,83±1,17
	ИГМ+ЦР	15	6,6 ∞	20 ∞	1,87±0,61 *	2,07±1,06 *
Подавленная ИС	ЛО	15	0	6,6	0,1±0,1	0,67±0,67
	ИГМ	20	50 #	75 #	6,68±0,77 # +	8,1±0,76 # +
	ИГМ+НГ	15	13,3 ∞	20 *	2,33±0,82 *	2,2±1,05 *
	ИГМ+ФТ	15	20 ∞	40	3,23±0,91 *	4,33±1,24 *
	ИГМ+ЦР	15	6,6 *	20 *	2,0±0,59 *	2,27±1,04 *
Стимулиро- ванная ИС	ЛО	15	0	0	0,07±0,05	0,07±0,05
	ИГМ	20	25 ^	40 #^	4,15±0,79 # ^	5,28±0,89 # ^
	ИГМ+НГ	15	13,3	20 ∞	1,97±0,85 *	2,27±1,04 *
	ИГМ+ФТ	15	6,6 ∞	20 ∞	1,73±0,62 *	2,3±1,04 *
	ИГМ+ЦР	15	26,6 +^	40 +^	3,47±1,07	4,00±1,31

Обозначения: N – общее количество животных в группе; % - общая летальность животных; ЛО – ложнооперированная группа; ИГМ – группа с ишемией головного мозга получавшая в качестве лечения физиологический раствор; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения НГ, ФТ и ЦР соответственно.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению с ЛО; * - по сравнению с группой ИГМ; ∞ - по сравнению с группой ИГМ (критерий хи-квадрат); + - по сравнению с аналогичной группой с неизменной ИС; ^ - по сравнению с аналогичной группой с подавленной ИС.

Введение нейроглютама животным с ИГМ способствовало увеличению ДА и ОИА при всех состояниях ИС, фенибута – при подавленном и стимулированном иммунитете, церебролизина – при интактной и подавленной ИС (таблица 5).

Общая летальность животных после двусторонней перевязки ОСА и выраженность неврологического дефицита в значительной степени зависят от кровоснабжения ГМ. Таким образом, через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА оценивали уровень МК (таблица 6).

Таблица 5. Оценка координации движений и мышечной силы в тесте Rota-Rod, двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте Открытое поле животных через 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии ОСА

Состояние ИС	Группы	Rota-Rod		Открытое поле	
		ЛП	Время	ДА	ОИА
Неизменная ИС	ЛО	38,1±3,0	117,4±5,9	29,1±1,7	20,3±1,4
	ИГМ	9,3±0,9 #	29,9±1,8 #	11,1±1,3 #	6,3±0,8 #
	ИГМ+НГ	28,1±2,1 *!	82,3±7,0 *!	19,5±1,8 *	14,1±1,7 *
	ИГМ+ФТ	16,6±1,5 *	50,5±4,2 *	14,2±1,3	7,1±1,1
	ИГМ+ЦР	26,7±2,0 *!	79,2±5,0 *!	19,5±2,0 *	13,4±1,5 *
Подавленная ИС	ЛО	32,7±2,3	101,2±8,5	25,2±1,2 +	16,1±1,6 +
	ИГМ	7,5±0,9 #	24,3±1,4 #+	6,3±1,2 #+	3,6±1,0 #+
	ИГМ+НГ	25,8±1,2 *	73,8±9,2 *	16,5±1,8 *!	12,9±1,5 *!
	ИГМ+ФТ	9,7±0,9 +	36,3±6,1	10,4±0,7 *+	6,0±0,6 *
	ИГМ+ЦР	24,6±2,4 *	70,1±5,9 *	17,9±1,2 *!	12,7±1,4*!
Стимулированная ИС	ЛО	35,1±2,7	119,9±7,4	27,3±2,0	18,5±1,4
	ИГМ	11,3±1,2 #^	44,1±4,7 #+^	15,0±1,5 #+^	4,5±0,8 #
	ИГМ+НГ	27,3±1,7 *!!	86,2±8,4 *!!	18,2±1,9	14,5±1,5 *!!
	ИГМ+ФТ	23,7±1,8 *+^	74,0±3,2 *+^!!	16,3±1,2 ^	11,4±1,3 *+^!!
	ИГМ+ЦР	18,2±1,3 *+^	56,1±3,5 *+^	13,7±1,7 +^	7,6±1,1 *+^

Обозначения: ДА – двигательная активность; ОИА – ориентировочно-исследовательская активность; ЛП – латентный период первого падения; Время – суммарное время удержания на вращающемся стержне. Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению с ЛО; * - по сравнению с группой ИГМ; + - по сравнению с аналогичной группой с неизменной ИС; ^ - по сравнению с аналогичной группой с подавленной ИС; ! - между группами получавшими НГ и ФТ, ЦР и ФТ; !! - между группами получавшими НГ и ЦР, ФТ и ЦР.

Таблица 6. Уровень локального мозгового кровотока и процент гидратации мозговой ткани после поэтапной необратимой окклюзии ОСА ($M \pm m$)

Состояние ИС	Группы	Мозговой кровоток (у.е.)	Процент гидратации (%)	Мозговой кровоток (у.е.)	Процент гидратации (%)
		через 72 часа		через 7 суток	
Неизменная ИС	ЛО	5,12±0,20	74,96±0,12	5,02±0,20	74,75±0,18
	ИГМ	2,87±0,18 #	75,71±0,18 #	2,95±0,19 #	75,62±0,13 #
	ИГМ+НГ	3,54±0,24 *	75,15±0,17 *	4,17±0,18 *\$	75,04±0,15 *
	ИГМ+ФТ	3,21±0,19	75,29±0,16	3,36±0,19	75,53±0,18
	ИГМ+ЦР	3,91±0,19 *	75,27±0,11*	4,09±0,23 *	75,23±0,13 *
Подавленная ИС	ЛО	4,97±0,20	75,19±0,15	4,94±0,20	74,47±0,13 \$
	ИГМ	2,77±0,21 #	75,63±0,13 #	2,89±0,24 #	75,47±0,37 #
	ИГМ+НГ	3,89±0,18 *	75,21±0,14 *	4,50±0,18 *\$!	74,35±0,19 *+\$
	ИГМ+ФТ	3,26±0,19	75,38±0,12	3,56±0,20 *	74,48±0,19 *+\$
	ИГМ+ЦР	4,22±0,23 *	74,94±0,11 *+	4,36±0,19 *!	74,15±0,28 *+\$
Стимулированная ИС	ЛО	4,97±0,21	75,24±0,11	5,10±0,20	74,99±0,26
	ИГМ	3,01±0,18 #	75,66±0,11 #	3,06±0,19 #	75,94±0,25 #
	ИГМ+НГ	3,92±0,20 *	75,41±0,10	4,36±0,23 *	74,96±0,16 *^\$
	ИГМ+ФТ	3,80±0,25 *+^	74,93±0,16 *^	4,53±0,19 *+^\$!!	74,96±0,20 *+
	ИГМ+ЦР	3,27±0,19 +^	75,28±0,13 *^	3,91±0,22 *\$	75,48±0,25 ^

Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению с ЛО; * - по сравнению с группой ИГМ; + - по сравнению с аналогичной группой с неизменной ИС; ^ - по сравнению с аналогичной группой с подавленной ИС; \$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе; ! - на 7 день лечения между группами получавшими НГ и ФТ, ЦР и ФТ; !! - на 7 день лечения между группами получавшими ФТ и ЦР.

Нейроглютам и церебролизин увеличивали МК при всех состояниях ИС. В свою очередь, фенибут только при подавленном и стимулированном иммунитете (таблица 6).

Известно, что при ИГМ имеет место воспалительная реакция, эндотелиальная дисфункция и вследствие этого есть риск развития отека мозга. Так как от его выраженности в значительной степени зависит исход инсульта, мы определяли степень гидратации мозговой ткани через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА у животных в условиях измененной ИС и получавших при этом исследуемые вещества (таблица 6).

Нейроглютам снижал процент гидратации ГМ независимо от состояния ИС крыс, фенибут - при подавленном и стимулированном иммунитете, церебролизин - при неизменном и подавленном (таблица 6).

Для дополнительной верификации степени повреждения ГМ при его ишемии на фоне различного состояния иммунитета определяли уровень NSE и MBP в сыворотке крови крыс через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА.

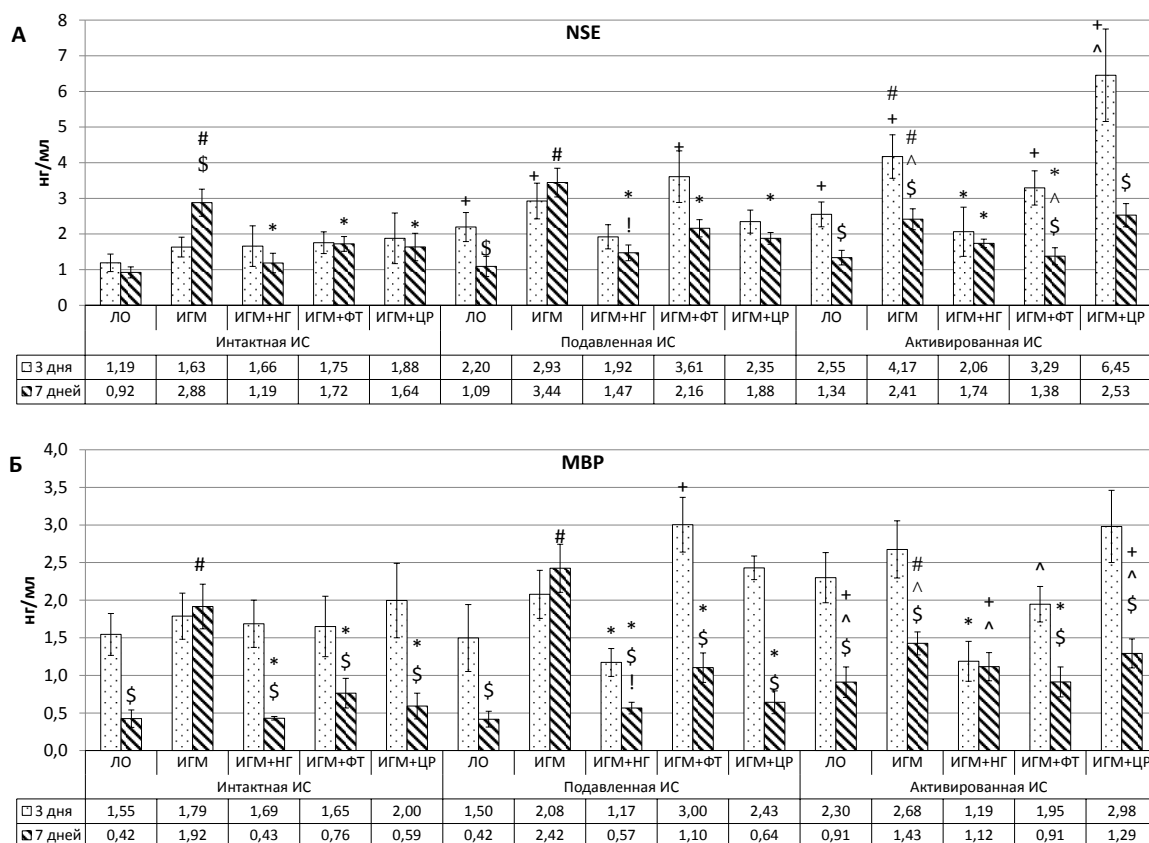


Рис. 1. Содержание А) нейронспецифической енолазы – NSE и Б) основного белка миелина – MBP в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии ОСА

Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению с ЛО; * - по сравнению с группой ИГМ; + - по сравнению с аналогичной группой с неизменной ИС; ^ - по сравнению с аналогичной группой с подавленной ИС; \$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе; ! - на 7 день лечения между группами получавшими НГ и ФТ.

Через 7 дней после ИГМ у животных группы контроль-ишемия при интактном и подавленном иммунитете наблюдался высокий уровень NSE.

Применение нейроглутама и фенибута способствовало снижению уровня NSE при всех состояниях ИС. Введение церебролизина приводило к снижению енолазы при неизменной и подавленной ИС (рис. 1).

Максимально высокий уровень МВР наблюдался при ишемии на фоне иммуносупрессии, при этом его концентрация была достоверно выше, чем в условиях иммуностимуляции. Аналогично данным полученным по степени повреждения нейронов ГМ было показано, что применение нейроглутама и фенибута снижало содержание МВР после 7-ми дневного применения при всех состояниях ИС, а церебролизина – при неизменном и подавленном иммунитете (рис. 1).

При иммуносупрессии у животных группы контроль-ишемия через 7 дней отмечался высокий уровень BDNF. Такую высокую концентрацию белка возможно объяснить продолжающейся гибелью нейронов ГМ, распадом мозговой ткани, нарушением целостности ГЭБ и соответственно выходом фактора BDNF в системный кровоток. Нейроглутам и фенибут снижали концентрацию белка при всех состояниях ИС, тогда как церебролизин – при неизменном и подавленном иммунитете (рис. 2).

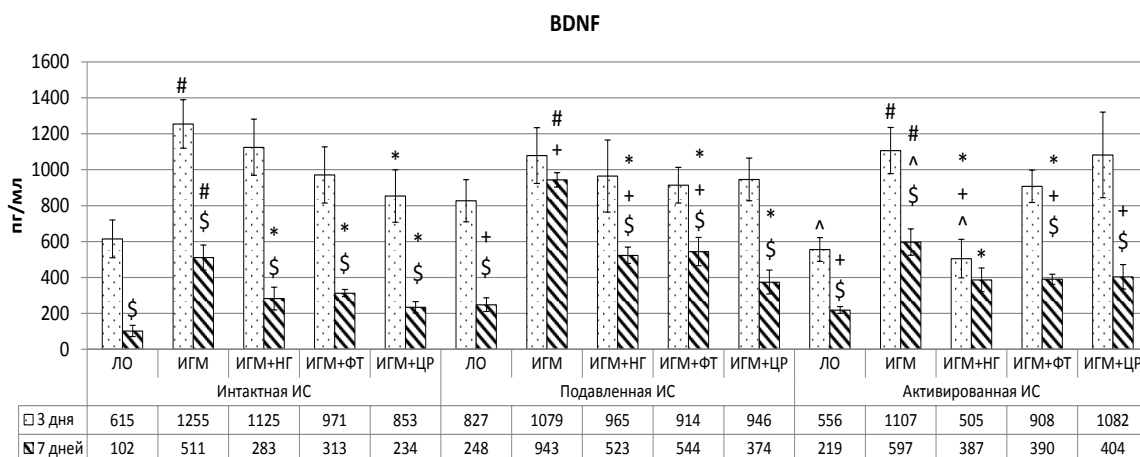


Рис. 2. Содержание нейротрофического фактора головного мозга – BDNF в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии ОСА

Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению с ЛО; * - по сравнению с группой ИГМ; + - по сравнению с аналогичной группой с неизменной ИС; ^ - по сравнению с аналогичной группой с подавленной ИС; \$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе.

В пятой главе представлены результаты исследования влияния веществ на составляющие иммунитета, оценка которых позволила более объективно судить о состоянии иммунного статуса животных при церебральной ишемии.

По снижению относительной массы иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки животных через 3 и 7 дней после НМК в условиях неизменного, подавленного и стимулированного иммунитета можно судить о качестве адаптационного ответа организма животного на нарушение гомеостаза.

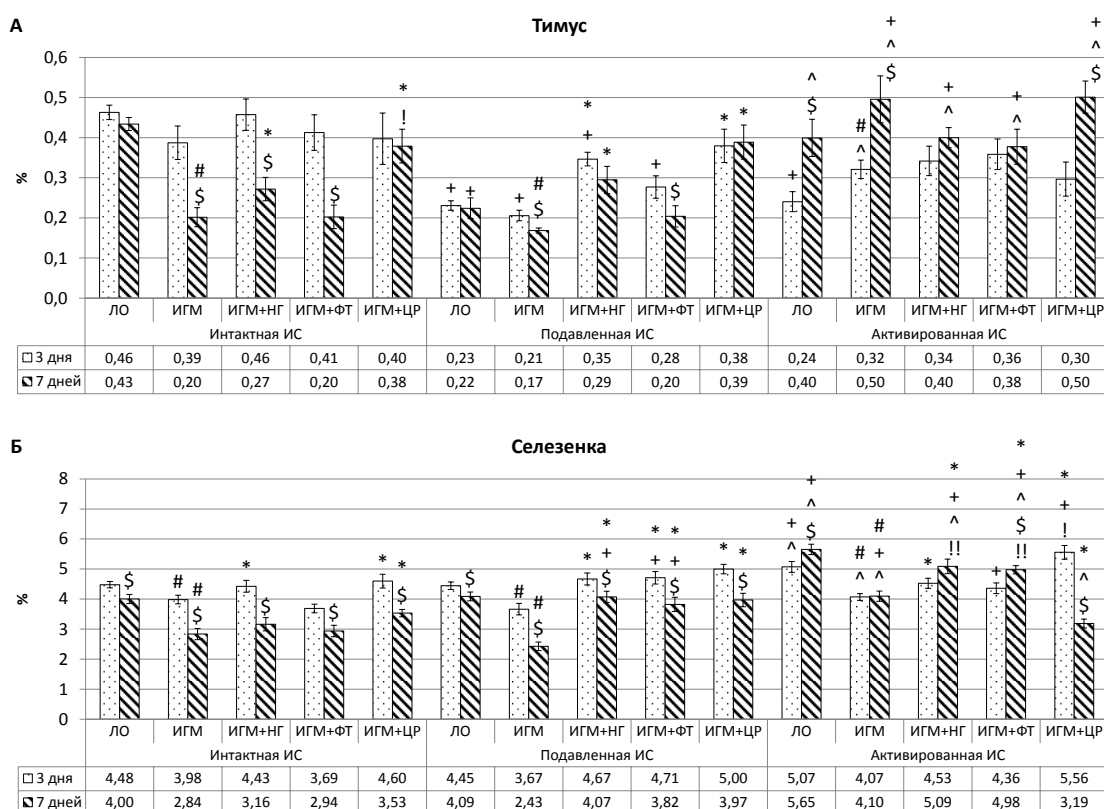


Рис. 3. Масса А) тимуса и Б) селезенки в процентном отношении к массе тела животного через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии ОСА

Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению с ЛО; * - по сравнению с группой ИГМ; + - по сравнению с аналогичной группой с неизменной ИС; ^ - по сравнению с аналогичной группой с подавленной ИС; \$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе; ! – на 3 и 7 день лечения между группами получавшими НГ и ЦР; !! – на 7 день лечения между группами получавшими НГ и ЦР, ФТ и ЦР.

В ходе исследований получены данные показывающие, что наибольшее снижение массового содержания тимуса и селезенки после окклюзии ОСА наблюдалось через 7 дней у животных с ИГМ на фоне подавленного иммунитета по сравнению с аналогичными показателями в условиях стимулированной ИС, что свидетельствует о большем истощении иммунокомпетентных органов и малом функциональном их резерве при иммуносупрессии (рис. 3).

Применение нейроглутама предотвращало снижение массы тимуса после окклюзии ОСА при всех состояниях ИС крыс, массы селезенки – при подавленном и стимулированном иммунитете. Введение фенибута увеличивало массу селезенки при подавленной и стимулированной ИС. Церебролизин нормализовал массу тимуса и селезенки в условиях неизменной и подавленной ИС и снижал вес селезенки при стимулированном иммунитете (рис. 3).

Ведущая роль в патогенезе ишемического инсульта принадлежит цитокинам, запускающим каскад метаболических процессов, которые могут привести к гибели нейронов и отеку мозговой ткани.

Ишемическое поражение ГМ в условиях иммуносупрессии в контрольной группе крыс протекает на фоне повышенного содержания провоспалительных IL-1 β и IL-6 (рис. 4).

Таким образом, изучив влияния исследуемых веществ на основные про- и противовоспалительные цитокины, возможно охарактеризовать вклад воспалительного компонента в развитие характерной неврологической симптоматики и исход ишемического инсульта.

Применение нейроглутама снижало уровень IL-1 β уже через 3 дня после окклюзии ОСА в условиях подавленного и стимулированного иммунитета. Фенибут снижал уровень данного цитокина через 7 дней после окклюзии ОСА при всех состояниях иммунитета. Церебролизин снижал уровень IL-1 β при неизменной и подавленной ИС, а при стимулированной увеличивал его, относительно значений группы контроль-ишемия (рис. 4).

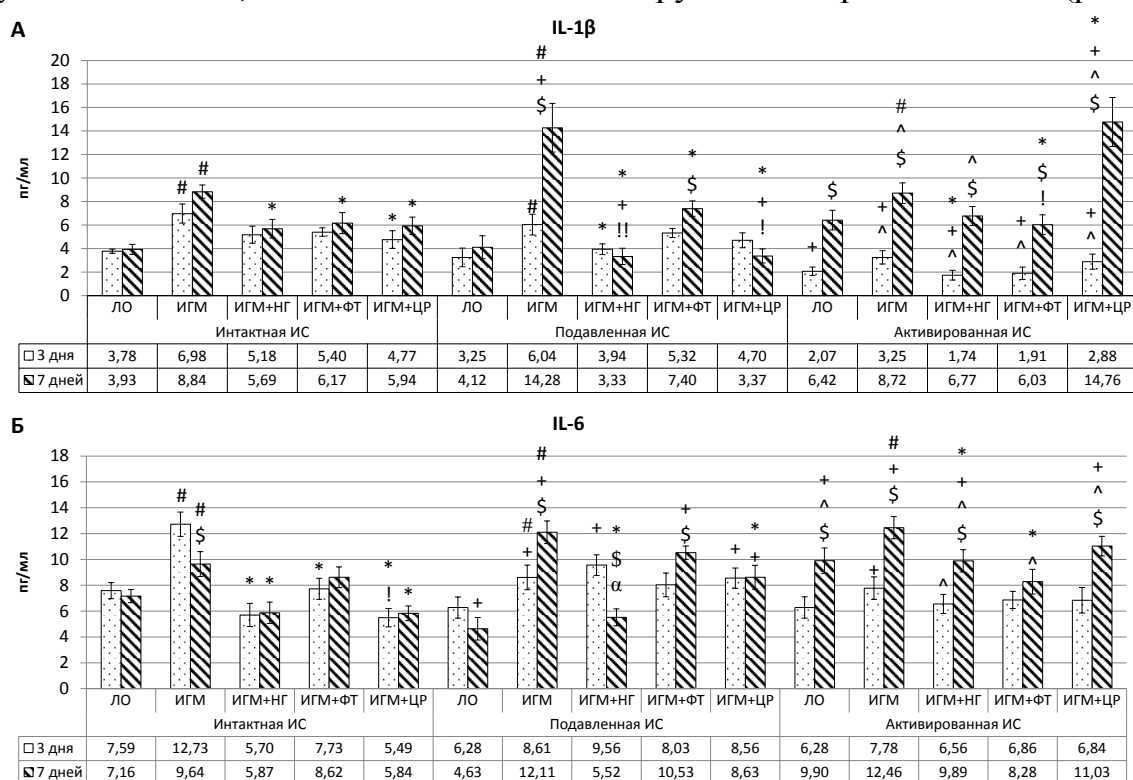


Рис. 4. Содержание интерлейкина А) IL-1 β и Б) IL-6 в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии ОСА

Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению с ЛО; * - по сравнению с группой ИГМ; + - по сравнению с аналогичной группой с неизменной ИС; ^ - по сравнению с аналогичной группой с подавленной ИС; \$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе; ! – на 3 и 7 день лечения между группами получавшими ФТ и ЦР; !! - на 7 день лечения между группами получавшими ФТ и НГ. α – на 7 день лечения между группами получавшими НГ и ЦР.

Нейроглютам снижал уровень IL-6 через 7 дней применения при всех состояниях ИС. Фенибут снижал через 3 дня при неизменной ИС, а через 7 при стимулированной, а церебролизин через 7 дней после окклюзии ОСА при неизменной и подавленной ИС (рис. 4).

Вместе с тем литературные данные позволяют предположить, что прогрессирование повреждения зоны пенумбры может происходить не

только под влиянием абсолютного увеличения концентрации провоспалительных цитокинов, но и вследствие недостатка противовоспалительных.

Нейроглутам увеличивал содержание противовоспалительного IL-4 через 3 дня применения при всех состояниях ИС, а через 7 при неизменном и подавленном иммунитете. Фенибут повышал IL-4 к 7 дню наблюдения при стимулированной ИС, в церебролизин при неизменной и подавленной (рис. 5).

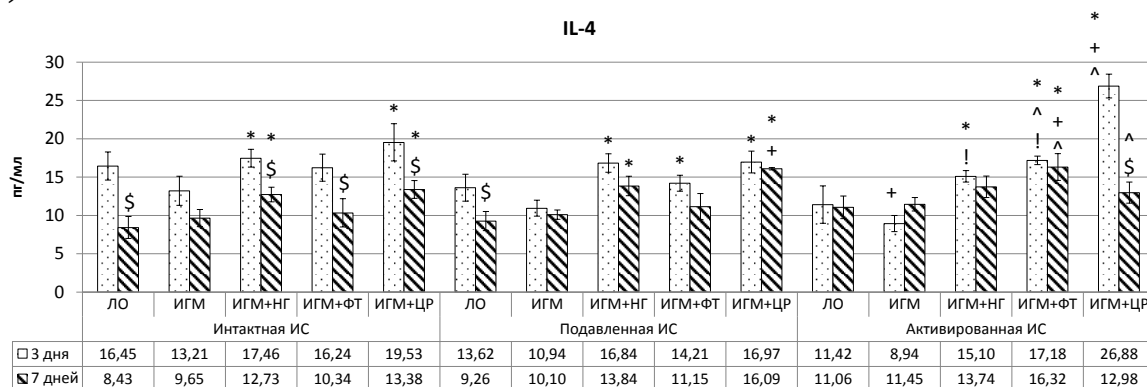


Рис. 5. Содержание интерлейкина IL-4 в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии ОСА

Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению с ЛО; * - по сравнению с группой ИГМ; + - по сравнению с аналогичной группой с неизменной ИС; ^ - по сравнению с аналогичной группой с подавленной ИС; \$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе; ! - на 3 день лечения между группами получавшими НГ и ЦР и ФТ и ЦР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экспериментальном НМК прослеживается взаимосвязь степени гидратации мозговой ткани, уровня мозгового кровотока с выраженностью неврологических нарушений у животных с ИГМ на фоне различного состояния ИС. Также отмечается неодинаковое нейропротекторное действие исследуемых веществ при неизменной, подавленной и стимулированной ИС. Недостаточность мозгового кровообращения, смоделированная на фоне иммуносупрессии, вызывает более тяжелые неврологические нарушения, выраженное поражение ЦНС, что сопровождается повышением содержания NSE, MBP и BDNF в системном кровотоке.

Нейроглутам при всех состояниях ИС способствовал уменьшению провоспалительного потенциала ИС: достоверно снижая уровень IL-1 β и IL-6 и увеличивая содержания цитокина IL-4 в сыворотке крыс после ишемического инсульта. Фенибут приводил к аналогичному эффекту при его применении в условиях стимулированной ИС, а церебролизин в условиях неизменной и подавленного иммунитета животных. Таким образом, терапия ИГМ нейроглутамом дала одинаково положительный результат при всех состояниях ИС. Фенибут оказывал наибольший нейропротективный эффект на фоне стимулированной ИС. Церебропротективные свойства препарата церебролизин в большей степени проявлялись в условиях неизменного и подавленного иммунитета.

Результаты представленного исследования указывают на необходимость учета состояния иммунитета при ОНМК и более дифференцировано назначать средства вторичной нейропротекции, учитывая их неодинаковое действие при различной активности иммунной системы, что вероятно может повысить эффективность проводимой терапии.

ВЫВОДЫ

1. Среди исследуемых соединений производное ГАМК – фенибут (25 мг/кг) и производное глутаминовой кислоты – нейроглютам (26 и 78 мг/кг) относительно контроля увеличивали процент активных нейтрофилов соответственно на 84, 113 и 69%; повышали их фагоцитарную активность на 30, 26 и 22%; стимулировали выработку эритроцитарных антител в РПГА при однократном введении на 38, 44 и 40% и при курсовом двухнедельном введении на 45, 67 и 60%; увеличивали Т-клеточный иммунный ответ в РГЗТ при однократном применении в 1,4; 1,6 и 1,3 раза, при двухнедельном введении фенибут повышал индекс РГЗТ в 1,2 раза, а нейроглютам в дозе 26 мг/кг снижал в 1,3 раза.

2. В условиях развития иммунного ответа на антигенный стимул фенибут (25 мг/кг) и нейроглютам (26 мг/кг) в тесте «ОП» повышали сниженную двигательную и ориентировочно исследовательскую активности соответственно в 3 и 2 раза; в тесте «ЧБК» увеличивали количество переходов между отсеками и количество исследовательских стоек в 3,3 и 2,8 раз; нивелировали признаки тревожности крыс, снижая число актов кратковременного груминга и количество фекальных болюсов на 45 и 41% и увеличивая количество заходов в центр «ОП», ЛП первого захода в темный отсек и суммарное время проведенное в светлом отсеке в «ЧБК» на 122 и 153%, что свидетельствует об оказании ими активирующего и анксиолитического действия.

3. Ишемия головного мозга у животных на фоне подавленной иммунной системы протекала значительно тяжелее, чем при неизменном и стимулированном иммунитете, о чем свидетельствовали: большая летальность животных (соответственно на 20 и 35% выше), высокий балл неврологического дефицита (в 1,3 и 1,5 раза выше), меньшая двигательная, ориентировочно-исследовательская активности и мышечная сила, большее нарушение координации движений, высокие концентрации в сыворотке крови NSE (соответственно на 16 и 30% выше) и MBP (на 21 и 41% выше), меньшее содержание NGF (на 13 и 44% меньше).

4. Курсовое 7-ми дневное введение фенибута в дозе 25 мг/кг оказывало наибольший нейропротекторный эффект при ишемии головного мозга на фоне стимулированной иммунной системы, что сопровождалось низкой смертностью (20%), меньшим проявлением неврологического дефицита (2,3 балла), более высоким уровнем мозгового кровотока (на 48% выше), высокими показателями поведения животных и снижением содержания нейронспецифических белков в сыворотке крови NSE на 43%, MBP на 36% по сравнению с показателями контрольной группы животных.

5. Выраженность церебропротекторного эффекта нейроглутама в дозе 26 мг/кг при введении в течение 7-ми дней после ишемического повреждения головного мозга не зависела от состояния иммунной системы крыс.

6. Церебролизин в дозе 2,5 мл/кг проявлял более выраженное нейропротекторное действие при ишемии головного мозга, протекающей в условиях неизмененного и подавленного иммунитета. Так, его применение в течение 7 дней после окклюзии ОСА сопровождалось высокой выживаемостью животных (80%), невысоким баллом неврологического дефицита (2,2 балла), более высокими показателями поведения животных, увеличением уровня мозгового кровотока на 45%, снижением уровня NSE и MBR на 44 и 72% соответственно, по сравнению с контрольной группой крыс в условиях неизмененного и подавленного иммунитета.

7. В группе животных с ишемией головного мозга в условиях подавленного иммунитета уровень провоспалительных цитокинов был выше, чем при неизменной (IL-1 β в 1,6; IL-6 в 1,3 раза) и стимулированной (IL-1 β в 1,7 раза) иммунной системе, а масса тимуса и селезенки меньше соответственно в 2,9 и 1,7 раза по сравнению с активированным иммунитетом.

8. В условиях неизменной и подавленной иммунной системы нейроглютам и церебролизин относительно значений контрольных групп снижали уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β на 34 и 76%, IL-6 на 39 и 41% соответственно, повышали содержание противовоспалительного IL-4 на 35 и 48% соответственно и увеличивали массу тимуса в 1,3-1,9 раз и 1,7-2,3 раза у крыс через 7 дней после окклюзии ОСА.

9. В условиях стимулированной иммунной системы применение нейроглутама и фенибута у крыс с ишемией головного мозга снижало уровень IL-1 β на 30%, IL-6 на 26%, а также повышало содержание IL-4 на 20 и 42% соответственно относительно значений группы контроль-ишемия.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные, свидетельствующие о зависимости терапевтического эффекта фенибута, нейроглутама и препарата сравнения церебролизина от фонового состояния иммунной системы животных при ишемическом повреждении головного мозга, подчеркивают необходимость учитывать состояние иммунитета при выборе средств вторичной нейропротекции нарушений мозгового кровообращения.

2. При поиске и разработке лекарственных средств для лечения ишемии головного мозга следует проводить скрининг и углубленное изучение их терапевтического действия в условиях измененного иммунитета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Тюренков И.Н. Влияние гидрохлорида бета-фенилглутаминовой кислоты (РГПУ-135, нейроглютам) на иммунную систему и психоэмоциональное

состояние животных / И.Н. Тюренков, Б.Ю. Гумилевский, **И.С. Филина**, М.А. Сомотруева, Д.А. Бакулин // Иммунология. – 2014.- Т. 35. – № 5. – С. 268-272.

2. Волотова Е.В. Влияние фенибута на память и поведение крыс различных возрастных групп, подвергшихся 7-дневному комбинированному стрессорному воздействию / Е.В. Волотова, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, **И.С. Филина**, И.Н. Тюренков // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – № 1 (49). – С. 23–26.

3. Тюренков И.Н. Влияние иммунизации на адаптационные механизмы при хроническом стрессировании животных / И.Н. Тюренков, **И.С. Филина**, Б.Ю. Гумилевский, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7 (2). – С. 368-371.

4. Тюренков И.Н. Ишемия головного мозга на фоне подавления и активации иммунитета / И.Н. Тюренков, Б.Ю. Гумилевский, **И.С. Филина**, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. - № 9. – Вып. 2. – С. 23-29.

5. Волотова Е.В. Нейропротекторное действие фенибута и нейроглутама при экспериментальной ишемии головного мозга на фоне измененной иммунореактивности / Е.В. Волотова, **И.С. Филина**, Д.А. Бакулин, Д.В. Куркин, И.Н. Тюренков // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Том 79. - № 4. – С. 93-100.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

6. Пастухова И.С. Исследование иммуностропных свойств нового производного глутаминовой кислоты / **И.С. Пастухова**, Б.Ю. Гумилевский // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета: приложение (Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств»). – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2012. – С. 127-128.

7. Лифанова Н.А. Влияние нового производного глутаминовой кислоты РГПУ-202 на гуморальный иммунный ответ / Н.А. Лифанова, **И.С. Пастухова** // Материалы 71-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 265-266.

8. Пастухова И.С. Влияние нового производного глутаминовой кислоты – РГПУ-135 на тревожное поведение животных в период развития иммунного ответа на антигенный стимул / **И.С. Пастухова**, Н.А. Лифанова // Материалы 67-ой итоговой научной конференции молодых ученых Ростовского государственного медицинского университета с международным участием в рамках «Недели медицинской науки». – Ростов-на-Дону.: ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России, 2013. – С. 421-422.

9. Пастухова И.С. Влияние глутарона на гуморальный и клеточный иммунный ответ и психоэмоциональное состояние животных / **И.С.**

Пастухова, Б.Ю. Гумилевский, И.Н. Тюренков // Российский иммунологический журнал: приложение (Материалы Объединенного иммунологического форума-2013). – Нижний Новгород.: Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16). - № 2-3(1). – С. 167-168.

10. Филина И.С. Влияние производного глутаминовой кислоты РГПУ -202 на поведение животных и фагоцитарные показатели периферической крови / **И.С. Филина** // Материалы XVIII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области: Тезисы докладов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 51-53.

11. Филина И.С. Анксиоседативные свойства соединения РГПУ -202 в условиях развития иммунного ответа на антиген / **И.С. Филина** // Материалы V Международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения-2013»: Тезисы. – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 355.

12. Мазина Н.В. Влияние производного глутаминовой кислоты (РГПУ-202) на мозговое кровообращение животных с необратимой двусторонней перевязкой общих сонных артерий / Н.В. Мазина, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин, **И.С. Филина** // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета: приложение (Материалы V Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств»). – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2014. – С. 76-77.

13. Филина И.С. Влияние нейроглутама на гуморальный иммунитет и поведение иммунизированных животных / **И.С. Филина**, Н.В. Мазина, Б.Ю. Гумилевский // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета: приложение (Материалы V Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств»). – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2014. – С. 140-141.

14. Тюренков И.Н. Влияние иммунного статуса организма на церебропротекторные эффекты при ишемии ГМ / И.Н. Тюренков, **И.С. Филина**, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин // Экспериментальная и клиническая фармакология: приложение (Материалы 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам»). – Москва.: Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – С. 59.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГМ – головной мозг

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДА – двигательная активность

ИГМ – ишемия головного мозга / группа животных, с ишемией головного мозга получавшая в качестве лечения физиологический раствор

ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных, с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения НГ, ФТ и ЦР соответственно

ИС – иммунная система
ЛО – ложнооперированная группа животных
ЛП – латентный период
ЛПС – липополисахарид
МК – мозговой кровоток
НГ – нейроглютам
НМК – нарушение мозгового кровообращения
ОИА – ориентировочно-исследовательская активность
ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
ОП – открытое поле
ОСА – общая сонная артерия
РГЗТ – реакция гиперчувствительности замедленного типа
РПГА – реакция пассивной гемагглютинации
ФТ – фенибут
ЦНС – центральная нервная система
ЦР - церебролизин
ЧБК – черно-белая камера
BDNF – нейротрофический фактор головного мозга
IL-1 β , 6, 4 – интерлейкин 1 β , 6, 4
MBP – основной белок миелина
NSE – нейронспецифическая енолаза

**Филина
Инга Сергеевна**

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ И ИММУНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА
ФЕНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГАМК И ГЛУТАМИНОВОЙ
КИСЛОТЫ ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ
ИЗМЕНЕННОГО ИММУНИТЕТА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук