

МАЗИНА НАТАЛЬЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**Церебро – и эндотелиопротекторные свойства ароматических
производных ГАМК и глутаминовой кислоты при моделировании
ишемии головного мозга**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ВОЛГОГРАД – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Тюренков Иван Николаевич**
член-корреспондент РАН, профессор,
доктор медицинских наук

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

Яворский Александр Николаевич
профессор, доктор медицинских наук,
Ученый секретарь ФГБУ «Научный центр
экспертизы средств медицинского
применения» МЗ РФ

Ведущая организация: "Южно-Уральский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « ____ » июня 2016 г. в _____ часов
на заседании Диссертационного совета Д 208.008.02 при Волгоградском
государственном медицинском университете (400131, Россия, г. Волгоград,
пл. Павших борцов, 1)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Волгоградского
государственного медицинского университета по адресу: 400131, Россия, г.
Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru
Автореферат разослан « ____ » май 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства мозгового кровообращения по-прежнему занимают лидирующие позиции среди причин смертности и стойкой утраты трудоспособности, приобретая тем самым огромное медико-социальное значение (Гусев Е.И. и др., 2013; Коваленко А.В., 2015; Петров Ю.Г., 2015). Ежегодно от инсульта погибают около 5 млн. человек, около 15 млн. человек переносят не фатальный инсульт. Число пациентов с сосудистыми поражениями мозга неуклонно растёт с каждым годом, прогнозируемая частота фатальных исходов от инсультов к 2020 году достигнет 7,7 млн, если не будут предприняты меры в борьбе с данной эпидемией. Основным методом лечения нарушений мозгового кровообращения остаётся фармакотерапия. Однако, существующие на сегодняшний день препараты для лечения острых и хронических нарушений мозгового кровообращения (НМК) в полной мере не удовлетворяют по своей эффективности ни клиницистов, ни пациентов (Гусев Е.И. и др., 2013; Рябченко А. Ю., 2014; Макарова Л.М., 2014; Данилов В.И. и др., 2014; Bettger P.J., et al., 2014). Одним из современных направлений в поиске и создании новых препаратов для лечения и профилактики НМК является мультитаргетное воздействие на факторы риска развития и этапы патогенеза основного заболевания, что позволяет снижать риск полипрагмазии в клинических условиях.

С этой точки зрения интерес представляют производные нейроактивных аминокислот (гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), глутаминовой кислоты (ГК)), обладающие широким спектром действия (уменьшают активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, ограничивают симпатическое влияние на сосуды, обладают антиоксидантной, антигипоксантной и антитромботической активностью, в том числе, по мнению ряда авторов, и эндотелиопротекторным действием) (Бородкина Л. Е. 2009; Тюренков И. Н., 2008; Курдюмов И.Н. 2009; Воронков А. В, 2012, Волотова Е.В.и др, 2013; Макарова, Л.М. 2013; Куркин Д.В., 2013; Киселёв А.В., 2014; Тюренков И. Н. и др., 2014; Литвинов А.А., 2015). Совокупность свойств, характерных для данных производных, делает целесообразным поиск веществ с церебро- и эндотелиопротекторными свойствами в ряду производных нейроактивных аминокислот (ГАМК, ГК).

Степень разработанности проблемы

В настоящее время на фармацевтическом рынке существует обширный спектр средств терапии и профилактики НМК, в том числе и на основе производных нейроактивных кислот (пикамилон, аминалон и др.), применяющиеся для лечения указанной патологии, однако оказываемое ими церебропротекторное действие недостаточно эффективно в клинических условиях.

В исследованиях последних лет установлено, что нарушения нормального функционирования эндотелия является фактором риска развития различных сердечно-сосудистых заболеваний, включая и НМК (Казак М.В., 2008; Рябченко А.Ю. 2014; Старых Е.П. 2015, Федин А.И. и др., 2015). Выбатывая в норме различные биологически активные вещества,

эндотелий принимает непосредственное участие в поддержании сосудистого тонуса, атромбогенности сосудистой стенки, регуляции адгезии и агрегации тромбоцитов, проявляет про- и антикоагулянтную, фибринолитическую активность, участвует в процессах воспаления и ангиогенеза (Maltais S., et al., 2011; Secomb T. W., Pries A. R., 2011; Mudau M., 2012; Булаева Н.И., 2013; Курапова М.В., 2015). Эндотелий сосудов постоянно подвержен воздействию различных неблагоприятных факторов: высокого артериального давления, активных форм кислорода, гликированных белков (при сахарном диабете), снижению эстрогенов и прогестеронов, стресса и многих других, которые могут провоцировать развитие эндотелиальной дисфункции (ЭД), сопровождающейся недостаточной выработкой NO-синтазы, снижением выработки веществ, оказывающих вазодилатирующее, антитромботическое, противовоспалительное, антипролиферативное действие. Установлено, что при снижении выработки половых гормонов, значительно возрастает риск развития сердечно-сосудистых осложнений, в том числе острых и хронических НМК. Поэтому своевременное назначение эндотелиопротекторных препаратов лицам, имеющим один или несколько факторов риска развития цереброваскулярных заболеваний, позволит улучшить их прогноз, а включение эндотелиопротекторов в терапию НМК может повысить эффективность её лечения.

На сегодняшний день известно о положительном влиянии на функциональное состояние эндотелия препаратов различных фармакологических групп (статинов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, β -блокаторов, ингибиторов фосфодиэстеразы и др.) (Тюренков И.Н. и др., 2012). Однако, если не считать сердечно-сосудистых средств с плеiotропным (эндотелиопротекторным) действием, других высокоэффективных препаратов коррекции ЭД с доказанной клинической эффективностью нет.

Таким образом, актуальной проблемой экспериментальной и клинической фармакологии является поиск веществ для профилактики и лечения НМК с церебро- и эндотелиопротекторным действием.

Цель исследования

Экспериментально обосновать возможность применения производных ГАМК и глутаминовой кислоты с ароматическими заместителями, обладающих эндотелиопротекторными свойствами, для лечения нарушений мозгового кровообращения.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести скрининг соединений, обладающих церебро- и эндотелиопротекторной активностью, в ряду производных ГАМК и глутаминовой кислоты с ароматическими заместителями в условиях ишемического – реперфузионного повреждения головного мозга и на модели

необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий с оценкой выживаемости животных, степени психоневрологического дефицита, состояния мозгового кровообращения.

2. Провести анализ зависимости «доза-эффект» для веществ, оказывающих наиболее выраженное церебро- и эндотелиопротекторное действие при НМК, сопоставив их эффективность.

3. Изучить влияние курсового 7-ми дневного введения соединения-лидера на степень психоневрологического дефицита, уровень мозгового кровотока (МК) при фокальной ишемии головного мозга у овариозэктомированных крыс.

4. Изучить возможные механизмы церебро- и эндотелиопротекторного действия наиболее активного соединения, оценив его влияние на вазодилатирующую функцию эндотелия, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность ферментов антиоксидантной системы (СОД и каталазы), на тромбоцитарный и плазменный компоненты гемостаза при фокальной ишемии головного мозга в условиях гипоестрогениндуцированной эндотелиальной дисфункции.

Научная новизна исследования

Впервые проведено изучение церебро- и эндотелиопротекторного действия новых производных ГАМК и глутаминовой кислоты с ароматическими заместителями в различных дозах на моделях обратимой билатеральной окклюзии, необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий, фокальной ишемии головного мозга.

Впервые изучено влияние курсового лечебного введения соединения РГПУ-195 в наиболее эффективной дозе при фокальной ишемии головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов у крыс самок. Проанализировано влияние данных веществ на уровень мозгового кровотока, вазодилатирующую функцию эндотелия, психоневрологический статус животных, процессы ПОЛ и активность антиоксидантной системы, основные параметры гемостаза, что позволило выделить вещество, перспективное для дальнейшей разработки в качестве церебро- и эндотелиопротекторного средства для лечения различных нарушений мозгового кровообращения.

Научно-практическая ценность и реализация результатов работы

Полученные данные о церебро- и эндотелиопротекторном действии производных ГАМК и ГК свидетельствуют о перспективности разработки на основе данных соединений средств, улучшающих мозговое кровообращение.

Полученные в работе данные используются в учебном процессе на кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей ВолгГМУ и химиками-синтетиками Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена (Санкт-Петербург) при целенаправленном синтезе и поиске химических соединений, обладающих церебро- и эндотелиопротекторным действием.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди ароматических производных ГАМК и глутаминовой кислоты наиболее выраженным церебропротекторным действием при транзиторной, перманентной и фокальной ишемии головного мозга обладает производное ГАМК с пиридиловым заместителем в β -положении (соединение РГПУ-195). Данное соединение уменьшает выраженность явлений гипер- и гипоперфузии в постреперфузионный период, повышает выживаемость, снижает степень неврологических нарушений, улучшает МК и вазодилатирующую функцию эндотелия у животных, перенёсших неполную и фокальную ишемию головного мозга.
2. Механизм нейропротекторного действия соединения РГПУ-195 при НМК обусловлен улучшением эндотелийзависимой вазодилатации, способностью снижать продукты ПОЛ, повышать активность ферментов антиоксидантных систем и утилизацию глюкозы, улучшать тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз и степень гидратации мозговой ткани.

Методология исследования

В проведённом исследовании использовался комплексный подход по оценке влияния новых производных ГАМК и ГК на мозговое кровообращение в условиях нормы и эндотелиальной дисфункции. Дизайн исследования соответствовал этическим правилам работы с лабораторными животными. В качестве теоретической и методологической основы использовались методические рекомендации отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме.

Исследование выполнено на современном уровне с использованием достаточного количества животных, современного оборудования и методов адекватных поставленным задачам, позволяющих получить репрезентативные и достоверные данные.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работы. Проведён анализ данных литературы по теме диссертации, на основании чего разработаны протоколы и дизайн экспериментов, проведены исследования, анализ и дальнейшее описание полученных результатов, которые отражены в научных публикациях.

Степень достоверности и апробация результатов

В работе использовалось современное, высокотехнологичное оборудование и современные методы исследования, с помощью которых был получен значительный объём экспериментальных данных, проанализированный общепринятыми методами и критериями статистической обработки данных, что позволяет судить о степени достоверности результатов исследования. Материалы работы были представлены на целом ряде научных форумов: 3-м Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии», Волгоград – 2011 г., БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики, Минск: ГУ РНМБ, 2011 г., VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научной

медицинской конференции (Москва, 15 марта 2012 г.), аспирантских и докторантских чтениях: Дерзания нового времени – поиск инноваций: Москва, 2012 г., 70-ой открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием – Волгоград: 2012, на 14-м Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство»:– Москва, 2012 г., «Инновации в современной фармакологии» – Казань 2012., V Международный молодёжный медицинский конгресс, «Санкт-Петербургские научные чтения – 2013 г.», V Всероссийском научно-практическом семинаре молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств»). – 2014 г.. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав исследований, обсуждения результатов, выводов и списка используемой литературы, включающего 279 источников, из них 175 отечественных и 104 зарубежных автора. Диссертация изложена на 167 странице машинописного текста, содержит таблиц –22, рисунков –30.

Основное содержание работы

В первой главе приведены данные о том, что сосудистая патология нервной системы перестала быть только медицинской проблемой и давно приобрела черты социально-экономической. Показано, что ведущую роль в прогрессировании, а зачастую, и в формировании нарушений мозгового кровообращения играет эндотелиальная дисфункция, приводящая к увеличению риска возникновения ишемических инсультов. На данный момент отдельного класса эндотелиопротекторных средств не существует, потенциально могут ими стать производные ГАМК и глутаминовой кислоты, которые обладают поливалентным механизмом действия и улучшают кровоснабжение головного мозга в условиях дисфункции эндотелия.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. Исследование выполнено на 522 крысах самках и самцах. Животные были получены из питомников «Столбовая» РАМН, (Московская обл.) и ФГПУ «Рапполово» РАМН (Ленинградская область). Эксперименты были одобрены комитетом по этической экспертизе доклинических исследований ВолгГМУ (протокол № 129-2011 от 5 марта 2011г.).

В работе оценена церебро- и эндотелиопротекторная активность производных ГАМК (соединения РГПУ-136, РГПУ-195) и глутаминовой кислоты (соединения РГПУ-135, РГПУ-146, РГПУ-202, РГПУ-217) с ароматическими заместителями. В качестве препаратов позитивного контроля использовали фенибут, полученный на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.Н. Герцена (Санкт- Петербург, Россия) и кавинтон (раствор для внутривенного и внутримышечного введения 5 мг/мл Gedeon Richter (Венгрия)).

На начальном этапе исследуемые вещества вводились в дозах (мг/кг), составляющих 1/10 от молекулярной массы, которые были подобраны на основании результатов токсикологических исследований, проведенных ранее на кафедре с учетом положения о том, что для большинства производных ГАМК и ГК диапазон терапевтических доз укладывается в интервале от 1/100 до 1/30 от LD₅₀ (мг/кг) (при этом считается, что доза 1/100 от LD₅₀ (мг/кг) потенциально является минимальной эффективной, а 1/30 от LD₅₀ (мг/кг) – максимальной безопасной и эффективной и, как правило, близка к 1/10 от молекулярной массы). При углубленном исследовании препаратов лидеров анализ осуществлялся в широком диапазоне доз (табл.1).

Таблица 1.

Дозы исследуемых веществ

Название вещества	Исследуемые дозы, мг/кг	Название вещества	Исследуемые дозы, мг/кг
РГПУ-135	13, 26, 52, 78	РГПУ-195	11, 22, 44, 88
РГПУ-136	22	РГПУ-146	29
РГПУ-202	27	РГПУ-217	30
Фенибут	25	Кавинтон	3,2

Режимы введения исследуемых соединений и препаратов сравнения были следующие: 1) на этапе скрининга и изучения зависимости доза-эффект соединения и препараты сравнения вводились однократно профилактически за 30 минут до наложения окклюдеров на сонные артерии, внутривенно при ишемически-реперфузионном повреждении и внутрибрюшинно при необратимой окклюзии общих сонных артерий. 2) при моделировании фокальной ишемии на фоне недостаточности половых гормонов – внутрибрюшинно ежедневно однократно в течение 7 дней после фокальной ишемии головного мозга (ФИМ).

При моделировании ишемии путём обратимой окклюзии общих сонных артерий были сформированы группы численностью n=6 для исследуемых соединений. При моделировании необратимой окклюзии общих сонных артерий группы состояли из 20 животных, для ложнооперированной – из 10 животных. При фокальной ишемии группы были численностью n =12. Для воспроизведения нарушений мозгового кровообращения были использованы модели: 1) модель обратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий (Мирзоян Р.С., 2003), 2) необратимой одномоментной билатеральной окклюзией общих сонных артерий у крыс (Yamamoto M. et al., 1983), 3) Метод моделирования фокальной ишемии головного мозга, вызванной необратимой окклюзией средней мозговой артерии (Koizumi J. et al., 1986). Учитывая то, что наиболее быстрые и тяжёлые нарушения функции эндотелия наблюдаются при заболеваниях, связанных с гормональной патологией, нами был проведён блок исследований на фоне недостаточности половых гормонов, которая формировалась путем экстирпации матки с придатками у самок крыс.

После моделируемой ишемии головного мозга анализировали степень выраженности психоневрологических нарушений.

Неврологический статус крыс после окклюзии общих сонных артерий оценивали по шкале stroke-index McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной (1996), при фокальной ишемии – использовали 9-бальная шкала Combs D'Alecy (Combs D.J. et al., 1987) и шкала Garcia (Garcia J.H. et al., 1995). Изменения в поведенческом статусе и когнитивных функциях у животных регистрировали в тестах «открытое поле» (ОП), «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ), тест «экстраполяционного избавления» (ТЭИ) (Воронина Т.А. и др., 2000; Бондаренко Н.А., 1990; Миронов А.Н. и др., 2012). Оценка моторных асимметрических нарушений проводили в тестах «сужающаяся дорожка» (Schallert T. и др., 2002) и «лестница» («Staircase test») (Montoya C.P. и др., 1991).

Регистрацию мозгового кровотока (МК) осуществляли в теменной области головного мозга крыс, наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) с помощью ультразвукового доплерографа для исследования кровотока ММ-ДК производства компании «Минимакс», Санкт-Петербург, Россия.

Вазодилатирующую функцию эндотелия оценивали по реакции мозговых сосудов (изменению мозгового кровотока) в условиях модификации синтеза эндогенного оксида азота при внутривенном введении анализаторов (Тюренков И.Н. и др., 2008, 2009, 2010).

Для *определения количества десквамированных (циркулирующих) эндотелиальных клеток (ЦЭК)* в крови использовали метод, который основан на изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью АДФ (Hladovec J., 1978; Петрищев Н.Н. и др., 2001).

Выраженность постишемического отека головного мозга оценивали по степени гидратации тканей головного мозга крыс (Hayashi T., Itoyama Y., Abe R., 2001).

Потребление глюкозы головным мозгом определялось по разнице содержания глюкозы в артериальной и венозной крови (Колб В.Г. и др., 1982), согласно инструкции фирмы-производителя набора «Глюкоза-ФКД» (ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия). Для *определения концентрации ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в плазме крови* использовался набор фирмы Агат-Мед (Россия) основанного на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов с тиобарбитуровой кислотой. Определение активности супероксиддисмутазы проводили по методу В.А. Костюк (1990), который основан на реакции окисления кверцетина. Принцип *определения активности каталазы* основывается на способности пероксида водорода образовывать стойкий окрашенный комплекс с солями аммония (Королюк М.А. и др., 1988). Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов исследовали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220 LA) научно-производственной фирмы "Биола" (г. Москва) по методу Born G. (Born G.V., 1962) в модификации Габбасова З.А. и соавторов (Габбасов З.А. и др., 1989). *Плазменный (коагуляционный) гемостаз* оценивали

хронометрически на анализаторе показателей гемостаза АПГ2-01 “МИНИЛАБ 701” с использованием наборов реактивов производства НПО «Ренам» (Россия), были определены тромбиновое (ТВ), протромбиновое (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и содержание фибриногена (ФБ) с использованием классических методик (Баркаган З.С., 2001).

Статистическая обработка результатов исследования в зависимости от характера данных проводилась с использованием параметрических и непараметрических критериев. Статистически значимыми признавались различия при $p < 0,05$ и $p < 0,01$. Проверка данных на нормальность осуществлялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова (Реброва О.Ю., 2002). В случае подчинения данных нормальному распределению, для выявления различий выполнялся однофакторный дисперсионный анализ. При выявлении различий между выборками, множественное сравнение групп проводилось с помощью критерия Ньюмена-Кейлса (Гланц С., 1988; Реброва О.Ю., 2002). В случае принадлежности данных к ненормальному распределению, для выявления различий между группами использовался критерий Краскала-Уоллиса. Множественное сравнение групп между собой, проводилось с использованием непараметрического варианта критерия Данна, Ньюмена-Кейлса (Гланц С., 1988). Сравнение номинальных данных между группами проведено с использованием критерия χ^2 . Количественные показатели каждой группы животных были отражены в таблицах и тексте как $M \pm m$. Обработка данных производилась с помощью пакетов программ Microsoft Excel XP и BioStat 2008.

В третьей главе представлены результаты поиска веществ с цереброваскулярной активностью в ряду новых производных ГАМК и ГК в условиях ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга и при неполной ишемии, вызванной необратимой перевязкой общих сонных артерий.

При оценке влияния соединений на МК в условиях нормы и реперфузионном повреждении головного мозга было установлено, что введение производных ГАМК и ГК не вызывало существенных изменений уровня МК. В условиях транзиторной ишемии, вызванной обратимой 10-минутной окклюзией общих сонных артерий, способным сохранять уровень МК на более высоком уровне оказалось только одно производное ГАМК (РГПУ-195), а предварительное введение производных ГК не оказало значимого влияния в тех же условиях на МК.

Так меньшая площадь под кривой изменения уровня МК, т.е. менее выраженное его повышение или снижение относительно исходных значений, наблюдалось у животных, получавших соединение РГПУ-135 и РГПУ-195 (рис. 1). Таким образом, они способствовали поддержанию МК на более высоком уровне и уменьшали выраженность его постреперфузионных колебаний (гипер- и гипоперфузии).

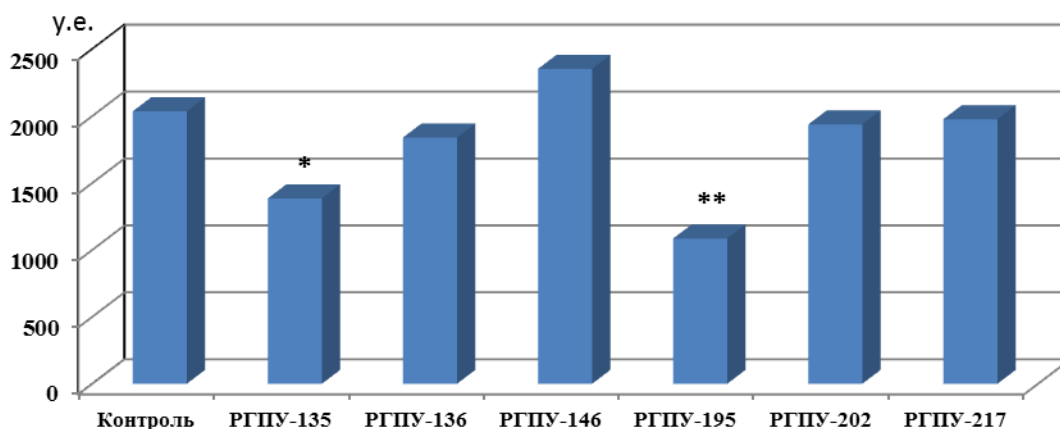


Рисунок 1. Изменение площади под кривой уровня МК под влиянием исследуемых соединений в условиях ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга.
Примечание: *, ** - $p < 0,05$, $p < 0,01$ различия достоверны по сравнению с группой контрольных животных

В следующем блоке исследований через 72 часа после необратимой перевязки сонных артерий было установлено, что наибольшей выживаемости животных способствовало предварительное введение соединений РГПУ-195, РГПУ-135 и РГПУ-202 и препаратов сравнения фенибут и кавинтон (табл.2).

Таблица 2.

Влияние соединений на летальность животных в условиях ишемии головного мозга, вызванной двусторонней необратимой перевязкой общих сонных артерий ($M \pm m$).

Группы	Время регистрации летальных исходов от момента операции, час.									
	6 часов		12 часов		24 часа		48 часов		72 часа	
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%
ЛО	0/10	0%	0/10	0%	0/10	0%	0/10	0%	0/10	0%
Контроль	5/20	25%	6/20	30%	8/20	40%	12/20	60%	14/20	70%
РГПУ-135 26 мг/кг	4/20	20%	5/20	25%	6/20	30%	7/20	35%	7/20	35%#
РГПУ-136 22 мг/кг	4/20	20%	4/20	20%	7/20	35%	8/20	40%	10/20	50%
РГПУ-146 30 мг/кг	2/20	10%	8/20	40%	10/20	50%	10/20	50%	12/20	60%
РГПУ-195 22 мг/кг	3/20	15%	4/20	20%	7/20	35%	8/20	40%	8/20	40%
РГПУ-202 27 мг/кг	5/20	25%	6/20	30%	7/20	35%	8/20	40%	8/20	40%
РГПУ-217 30 мг/кг	4/20	20%	8/20	40%	12/20	60%	12/20	60%	12/20	60%
Фенибут 25 мг/кг	2/20	10%	4/20	20%	6/20	30%	8/20	40%	8/20	40%
Кавинтон 3,2 мг/кг	2/20	10%	4/20	20%	4/20	20%	6/20	30%	6/20	30%#

Примечание: N – количество животных в группе; n – количество умерших животных в группе; ЛО – ложнооперированные животные; # – достоверно по отношению к группе животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшей физиологический раствор ($p < 0,05$).

На протяжении всего периода наблюдения после операции балл неврологического дефицита по шкале McGrow был ниже у животных, получавших соединения РГПУ-135 и РГПУ-195, чем у контрольных и сопоставим с баллами крыс, получавшими препараты-сравнения фенибут и кавинтон (табл.3).

Таблица 3.

Степень неврологических нарушений по шкале McGrow у животных после окклюзии сонных артерий ($M \pm m$).

Группы животных	Время после окклюзии сонных артерий				
	6 часов	12 часов	24 часа	48 часов	72 часа
ЛО	0,3±0,11	0	0	0	0
Контроль-ишемия	6,0±0,64	7,0±0,54	7,4±0,57	7,8±0,66	7,9±0,77
РГПУ-135 26 мг/кг	4,7±0,68	4,8±0,73#	5,2±0,78#	5,3±0,82#	5,0±0,87#
РГПУ-136 22 мг/кг	5±0,62	6,3±0,66	5,8±0,75	5,7±0,83	5,8±0,98
РГПУ-146 30 мг/кг	4,8±0,58	6,2±0,75	6,8±0,78	6,7±0,78	6,6±1,0
РГПУ-195 26 мг/кг	5 ±0,6	5±0,63#	5,7±0,9	5,5 ±0,88#	5,5 ±0,85#
РГПУ-202 27 мг/кг	5,3±0,68	6±0,72	6,1±0,77	6,2±0,8	5,9±0,84
РГПУ-217 30 мг/кг	4,7±0,64	5,9±0,78	7,0±0,85	6,9±0,87	6,8±0,41
Фенибут 25 мг/кг	5,7±0,5	6,1±0,54	5,8±0,7	6,0±0,79	5,7±0,84
Кавинтон 3,2 мг/кг	4,8±0,5	5,4±0,66	5,6±0,55 #	4,9±0,84#	4,7±0,86#

Примечание: # – различия достоверны по сравнению с группой негативного контроля (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).

Под влиянием фенильных аналогов ГК (РГПУ-135) и ГАМК (фенибут) у крыс с ишемией головного мозга двигательная активность была выше, чем при введении других исследуемых веществ, а ориентировочно-исследовательская активность была наибольшей при введении в структуру ГАМК пиридила (рис.2).

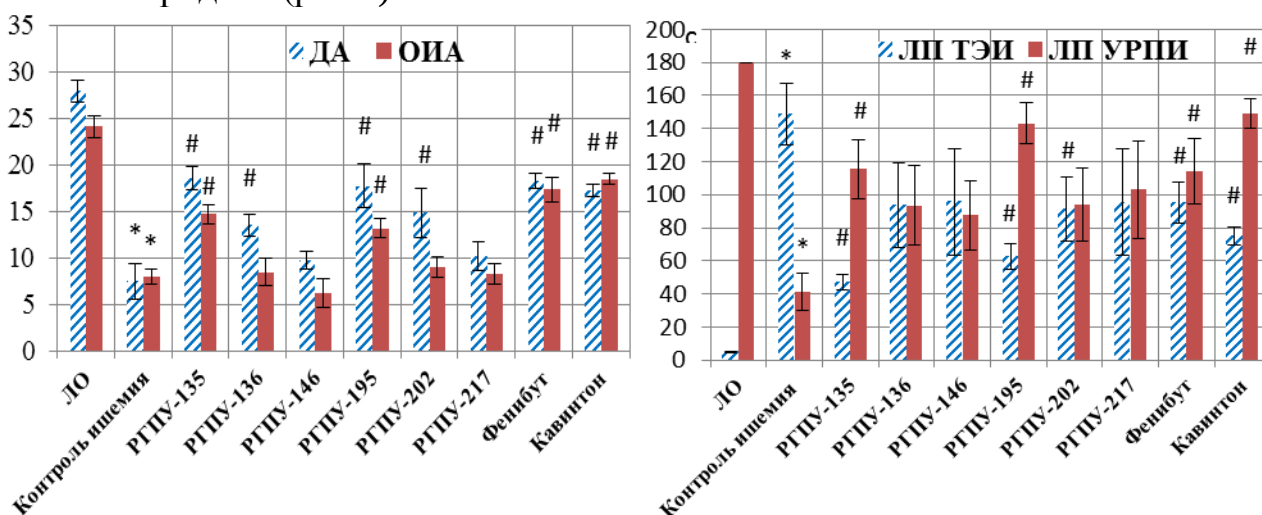


Рисунок 2. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, когнитивной и мнестической функции животных через 72 часа после необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий.

Примечание: ЛП – латентный период (с); ЛО – ложнооперированные животные; ДА – двигательная активность (количество пересечённых квадратов животными в тесте ОП); ОИА – ориентировочно-исследовательская активность (количество суммированных актов стояк и заглядываний в норки); * – различия достоверны по сравнению с ЛО ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).

Менее выраженные нарушения памяти при воспроизведении тестов ТЭИ и УРПИ наблюдались так же в группах, получавших соединения РГПУ-135 (производное ГК) и РГПУ-195 (производное ГАМК) (рис.3).

Показания уровня МК на 3 день после моделируемой патологии были достоверно выше у животных, получавших соединения РГПУ -135, РГПУ-195, фенибут и кавинтон, чем в группе негативного контроля (контроль-ишемия) и составили $3,32 \pm 0,11$, $3,34 \pm 0,1$, $2,92 \pm 0,15$ и $3,38 \pm 0,14$ соответственно (рис.3).

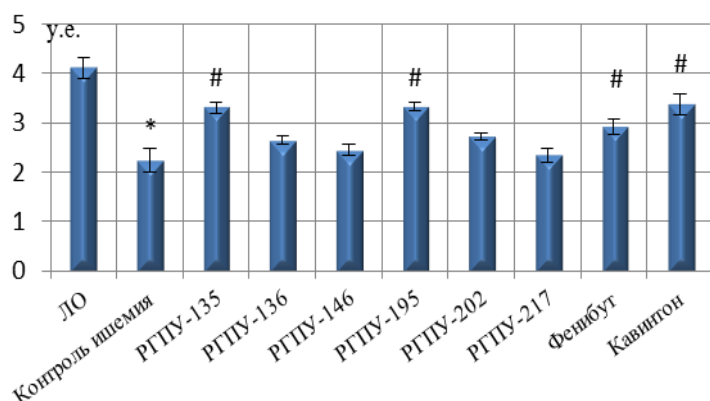


Рисунок 3. Оценка мозгового кровотока животных через 72 часа после необратимой одномоментной окклюзии общих сонных артерий.

*Примечание: ЛП – латентный период (с); ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны по сравнению с ЛО ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).*

Таким образом, наиболее выраженное нейропротекторное действие, сопоставимое с таковым у кавинтона, оказывали соединения РГПУ-135 (β-фенил ГК) и РГПУ-195 (β- пиридил ГАМК).

В четвёртой главе изучается церебро- и эндотелиопротекторная активность соединений РГПУ-195 и РГПУ-135 в зависимости от «доза-эффект» на модели билатеральной окклюзии общих сонных артерий.

Первые летальные исходы среди животных всех исследуемых групп, кроме получавших профилактически однократно соединение РГПУ-195 в дозах 44 и 88 мг/кг, были отмечены уже через 6 часов после окклюзии общих сонных артерий.

Соединение РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг к концу 3-их суток на 35% достоверно уменьшало гибель крыс после перевязки сонных артерий по сравнению с группой контроль-ишемия. Соединение РГПУ-195 (75% выживших) оказывало сопоставимое с кавинтоном церебропротекторное действие, превосходя таковое у фенибута и РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг (табл.4).

В группах животных, получавших исследуемые вещества, степень неврологических нарушений была менее выражена. Однако, профилактическое введение животным соединений РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг (в большей степени) и РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг (несколько в меньшей) снижало балл неврологического дефицита после необратимой окклюзии ОСА и данные были сопоставимы с кавинтоном (табл.5).

Таблица 4.

Влияние исследуемых веществ – РГПУ-135 и РГПУ-195 в разных дозах на выживаемость животных после необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий

Группа животных	Доза, мг/кг	Выживаемость животных после окклюзии ОСА									
		6 ч		12 ч		24 ч		48 ч		72 ч	
		n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%
ЛО	-	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%
Контроль-ишемия	-	20/15	75%	20/14	70%	20/12*	60%	20/8*	40%	20/6*	30%
РГПУ-135	13	20/16	80%	20/15	75%	20/13	65%	20/11	55%	20/10	45%
	26	20/15	75%	20/15	75%	20/14	70%	20/13 [#]	65%	20/13 [#]	65%
	52	20/16	80%	20/13	65%	20/11	55%	20/9	45%	20/8	40%
	78	20/16	80%	20/12	60%	20/10	50%	20/8	40%	20/8	40%
РГПУ-195	11	20/16	80%	20/14	70%	20/10	50%	20/8	40%	20/8	40%
	22	20/18	90%	20/16	80%	20/12	60%	20/12	60%	20/12	60%
	44	20/20	100%	20/16	80%	20/15	75%	20/15	75%	20/15 [#]	75%
	88	20/20	100%	20/14	70%	20/12	60%	20/10	50%	20/8	40%
Фенибут	25	20/16	80%	20/14	70%	20/12 [#]	60%	20/12 [#]	60%	20/12 [#]	60%
Кавинтон	3,2	20/18	90%	20/16	80%	20/15 [#]	75%	20/15 [#]	75%	20/15 [#]	75%

Примечание: n – количество животных в группе; N – количество выживших животных в группе; ЛО – ложнооперированные животные; * – различия достоверны по сравнению с ЛО группой ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (контроль-ишемия) ($p < 0,05$).

При оценке поведения животных в тесте ОП, когнитивных функций – в тестах УРПИ и ТЭИ было выявлено, что у животных, которым однократно превентивно вводились соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг, РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг и кавинтон в дозе 3,2 мг/кг выраженность двигательной, локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности (число пересеченных квадратов, сумма заглядываний в отверстия и вставания на задние лапы) были выше, чем у контрольной группы и при введении других исследуемых доз соединений. При воспроизведении ТЭИ и УРПИ у животных данных групп наблюдалась лучшая сохранность памятного следа, что выражалось в более быстром решении задачи экстраполяционного избавления и большем латентном периоде первого захода в темный отсек ($p < 0,05$) (табл.6).

Таблица 5.

Балл неврологического дефицита по шкале McGrow у животных после необратимой окклюзии сонных артерий на фоне однократного профилактического введения исследуемых соединений – РГПУ 135 и РГПУ-195 ($M \pm m$)

Группа животных	Доза, мг/кг	Время после необратимой окклюзии ОСА				
		6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	-	5,9±0,63	6,9±0,53	7,3±0,56	7,8±0,64	7,8±0,79
РГПУ-135	13	5,2±0,62	6±0,61	6,1±0,71	6,8±0,7	7,2±0,72
	26	4,8±0,71	4,7±0,74 [#]	5±0,79 [#]	5,1±0,84 [#]	4,9±0,88 [#]
	52	4,8±0,68	6,2±0,7	6,4±0,79	7,0±0,8	6,8±0,92
	78	4,8±0,61	6,4±0,75	6,7±0,79	7,2±0,8	6,8±0,91
РГПУ-195	11	5,5 ±0,63	6,0 ±0,71	6,9 ±0,76	7,7 ±0,71	7,2±0,82
	22	4,8 ±0,55	4,9 ±0,69 [#]	5,6 ±0,84	5,7 ±0,84 [#]	5,4 ±0,88 [#]
	44	4,2 ±0,36 [#]	4,6 ±0,66 [#]	4,7 ±0,84 [#]	4,6 ±0,81 [#]	4,6 ±0,8 [#]
	88	4,2±0,48 [#]	5,6±0,7	5,7±0,84	6,3±0,88	7,1±0,82
Фенибут	25	5,4±0,58	6,6±0,63	6,2±0,74	6,1±0,85	5,8±0,84
Кавинтон	3,2	4,9±0,49	5,2±0,64	5,1±0,77 [#]	4,9±0,73 [#]	4,6±0,77 [#]

Примечание: # – различия достоверны в сравнении с группой контроль-ишемия ($p < 0,05$).

Таблица 6.

Показатели поведенческого статуса и когнитивных функций животных на 3-и сутки после необратимой окклюзии сонных артерий на фоне однократного профилактического введения исследуемых композиций ($M \pm m$)

Группа животных	Доза (мг/кг)	Двигательная активность	ОИ активность	ЛП (ТЭИ)	ЛП (УРПИ)
ЛО		25,0±1,1	23,5±1,2	4,80±0,55	180,00±0,0
Контроль – ишемия		6,7±1,5*	6,0±0,9*	148,7±18,69*	41,33±11,27*
РГПУ-135	13	11,9±0,74 [#]	8,4±1,8	123,33±19,32	92,0±21,35
	26	17,6±0,8 [#]	12,2±1,1 [#]	89,38±17,43 [#]	143,8±12,48 [#]
	52	10,0±1,74	8,6±1,7	137,1±16,1	106,5±27,99
	78	9,9±1,8	9,1±1,5	135,00±18,16	101,13±28,66
РГПУ-195	11	6,0±1,20	6,8±1,3	121,30±33,99	49,50±10,22
	22	16,1±3,58	9,3±0,7 [#]	106,30±22,86	122,3±18,45 [#]
	44	19,3±1,53 [#]	13,7±1,8 [#]	93,40±14,94 [#]	147,86±13,59 [#]
	88	7,4±1,27	8,3±1,3	133,80±22,67	60,50±20,78
Фенибут	25	15,7±1,37	13,3±1,29	119,4±15,6	147,3±12,4 [#]
Кавинтон	3,2	19,8±1,0	20,9±0,9	98,90±9,6 [#]	159,40±8,70 [#]

Примечание: ЛО – группа ложнооперированных животных; ОИ – ориентировочно-исследовательская активность; ЛП – латентный период; * – различия достоверны в сравнении с ЛО ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$).

Интенсивность локального мозгового кровотока через 72 часа после ОСА в группе животных, получавших соединения РГПУ-195 и РГПУ-135,

была значительно выше относительно наблюдаемого в группах контрольных животных, однако, соединение РГПУ-195 в дозе 44мг/кг обеспечивало эффект сопоставимый с препаратом сравнения – кавинтоном и превосходил таковой у соединения РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг на 20,1%

Далее была проведена оценка ЭЗВД путем введения ацетилхолина. Установлено, что прирост кровотока у крыс, получавших соединение РГПУ-195 в дозе 44мг/кг после введения ацетилхолина был наибольший и составил $25,4 \pm 2,9\%$. Эти данные превышали показатели групп животных, получавших фенибут и соединение РГПУ-135 (13-78 мг/кг), прирост МК в которых составлял 16% и 6,81-21,8%, соответственно.

Наименьший индекс ЭД отмечен в экспериментальных группах, которым вводились соединение РГПУ-195 (44мг/кг) и препарат сравнения кавинтон (3,2 мг/кг). Пиридиловое производное ГАМК в дозе 44 мг/кг так же в большей степени способствовало достоверному снижению уровня ЦЭК по сравнению с показателями контрольной группы (табл.7).

Процент гидратации головного мозга у животных был меньше на фоне введения соединения РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг, чем во всех других группах и тем самым оно оказывало наибольший эндотелиопротекторный эффект относительно препаратов сравнения и соединения РГПУ-135.

Таблица 7.

Эндотелийзависимая и эндотелийнезависимая вазодилатация, индекс эндотелиальной дисфункции и количество циркулирующих эндотелиоцитов у животных через 72 часа после окклюзии общих сонных артерий

Группа	Доза, мг/кг	МК (у.е) исходный	Прирост кровотока (в %) на введение		Индекс ЭД	Количество ЦЭК (*10 ⁴ /л)
			ацетилхолина	нитроглицерина		
ЛО	-	4,11±0,21	28±2,6	39,9±3,6	0,27±0,07	2,9±0,6
Контроль-ишемия	-	2,25±0,24*	6±2,8*	38±2	0,84±0,07*	7,33±0,8*
РГПУ-135	13	2,59±0,15	6,81±1,28	35,3±2,0	0,8±0,04	7,11±0,96
	26	2,93±0,18#	21,8±1,28#	40±2,3	0,43±0,05#	4,23±0,38#
	52	2,64±0,18	8,4±2,2	36,1±2,0	0,75±0,07	5,42±0,67
	78	2,62±0,15	6,5±1,6	37,8±1,4	0,83±0,04	5,50±0,87
РГПУ-195	11	2,30±0,06	11,9±2,5	34,3±2,26	0,64±0,09	7,25±0,75
	22	2,98±0,11	22,1±1,8	37,4±2,0	0,40±0,06	4,83±0,75
	44	3,52±0,13#	25,4±2,9#	36,4±2,5	0,33±0,08#	3,71±0,42#
	88	2,40±0,16	11,0±2,27	37,6±2,5	0,71±0,06	6,00±0,41
Фенибут	25	2,92±0,13#	16±2,27	36±2,1	0,52±0,08	5,33±0,7
Кавинтон	3,2	3,54±0,15#	27,3±1,4#	37,9±1,5	0,3±0,03	4,13±0,4#

Примечание: МК – мозговой кровоток; *,# – $p < 0,05$ – различия достоверны соответственно по сравнению с ложнооперированными (ЛО) или контрольной группой животных

В пятой главе представлены результаты углубленного изучения возможных механизмов церебро- и эндотелиопротекторного действия

соединения РГПУ-195 при его курсовом лечебном введении животным, перенесшим фокальную ишемию на фоне гипоэстрогенемии.

При оценке неврологического статуса животных было установлено, что у крыс после моделирования ФИМ, наблюдалось снижение баллов по шкале Combs. Лечебное введение исследуемого соединения сглаживало тяжесть неврологического дефицита и к 7 суткам нарушения были менее выражены, чем у крыс контрольной группы и у животных, получавших препараты сравнения – фенибут и кавинтон. Оценка состояния животных по шкале Garcia так же свидетельствует о благоприятном эффекте курсового введения соединения РГПУ-195, который выражался в возрастании баллов к 7 суткам эксперимента до $15,67 \pm 0,36$, что статистически значимо отличалось от показателей животных, получавших физиологический раствор ($p < 0,05$) и превышало показатели в группах с препаратами сравнения (табл.8).

Таблица 8.

Выраженность неврологического дефицита на 7 сутки по шкале Garcia и Combs у животных после моделирования фокальной ишемии головного мозга на фоне НПГ

группа	Garcia	Combs
ЛО	$17,75 \pm 0,13$	$8,42 \pm 0,19$
контроль-ишемия	$11,00 \pm 0,49$	$2,25 \pm 0,41$
РГПУ-195 44 мг/кг	$15,67 \pm 0,36^*$	$6,50 \pm 0,29^*$
Фенибут 25 мг/кг	$12,83 \pm 0,44^*$	$2,67 \pm 0,36$
Кавинтон 3,2 мг/кг	$13,50 \pm 0,29^*$	$4,58 \pm 0,23^*$

Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных контроль-ишемия

Лучшее функциональное состояние сенсомоторной функции относительно показателей контрольной группы животных на всех участках в тесте «сужающаяся дорожка» отмечалось в группе крыс, получавших производное ГАМК – соединение РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг, что выражалось в меньшей разнице между совершёнными контралатеральными и ипсилатеральными ошибками и было сопоставимо с препаратом сравнения – кавинтон (табл.9).

Таблица 9.

Процент асимметрии у животных в Balance-beam test на различных участках пути дорожки через 7 суток после моделирования фокальной ишемии головного мозга на фоне овариоэктомии у крыс при лечебном курсовом введении исследуемых соединений (n=12)

группа	Широкая часть	Средняя часть	Узкая часть
ЛО	$-0,2 \pm 1,2 \%$	$-1,8 \pm 0,6 \%$	$-0,73 \pm 1,04 \%$
контроль-ишемия	$25,0 \pm 3,6 \%$	$30,0 \pm 25,7 \%$	$47,3 \pm 3,74 \%$
РГПУ-195, 44 мг/кг	$11,9 \pm 1,3 \%^*$	$11,4 \pm 2,1 \%^*$	$23,77 \pm 3,27 \%^*$
Фенибут 25 мг/кг	$18,0 \pm 2,4 \%$	$14,9 \pm 1,9 \%^*$	$35,06 \pm 3,63 \%^*$
Кавинтон 3,2 мг/кг	$14,1 \pm 1,9 \%^*$	$15,8 \pm 2,4 \%^*$	$24,32 \pm 3,49 \%^*$

Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных контроль-ишемия

Курсовое введение исследуемого соединения приводило к статистически значимому повышению количества собранных зерен как ипси- так и контрлатеральной конечностями относительно стороны повреждения в «тесте-лесница» по сравнению с животными контрольной группы при $p < 0,05$ (табл.10).

Таблица 10.

Количество зерен, собранных животными в тесте «Staircase-test» после моделирования фокальной ишемии мозга у овариоэктомизированных крыс (n=12)

Группы	Исход		7 сутки после ФИМ	
	ИЛ	КЛ	ИЛ	КЛ
ЛО	13,3±1,4	13,6±2,0	13,1±1,37	13,1±2,33
контроль-ишемия	13,2±2,0	14,1±1,7	11,1±2,33	5,10±1,66
РГПУ-195 44 мг/кг	13,4±1,4	14,1±1,9	13,4±1,43	10,3±1,34*
Фенибут 25 мг/кг	12,9±1,4	14,1±2,0	12,9±1,37	8,70±2,11*
Кавинтон 3,2 мг/кг	13,7±1,2	13,8±1,5	13,7±1,16	9,70±2,71*

*Примечания: ЛО – ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных контроль-ишемия, ИЛ-ипсилатеральная. КЛ- контрлатеральная*

На фоне курсового лечебного введения соединения РГПУ-195, в постинсультный период отмечались статистически более высокие показатели двигательной, исследовательской активности и наблюдалась лучшая сохранность памятного следа у крыс с НПГ относительно аналогичных показателей контрольной группы животных, что свидетельствует о положительном церебропротекторном действии, превосходящем препараты сравнения.

Уровень церебрального кровотока в группах животных с экспериментально вызванной недостаточностью половых гормонов и ФИМ был $1,18 \pm 0,07$, что достоверно ниже ($p < 0,05$) чем у крыс, которым вводили соединение РГПУ-195 ($2,77 \pm 0,17$).

При изучении мозгового кровотока, в условиях активации синтеза эндогенного оксида азота, при введении ацетилхолина и при блокаде синтеза эндогенного оксида азота с помощью нитро-L-аргинина было установлено, что у животных, получавших соединение РГПУ-195, сосудистая реакция в ответ на введение ацетилхолина ($3,32 \pm 0,12$) и нитро-L-аргинина ($1,98 \pm 0,13$) была достоверно выше, чем в группе контроль-ишемия ($1,30 \pm 0,07$ и $2,08 \pm 0,23$ соответственно), что свидетельствует о более высокой базальной и стимулируемой продукции оксида азота и, соответственно, менее выраженной эндотелиальной дисфункции на фоне введения исследуемого соединения (рис.4).

Процент гидратации мозговой ткани у животных, получавших соединения РГПУ-195 и кавинтон, был сопоставим с группой ЛО и достоверно менее выражен относительно группы контроля.

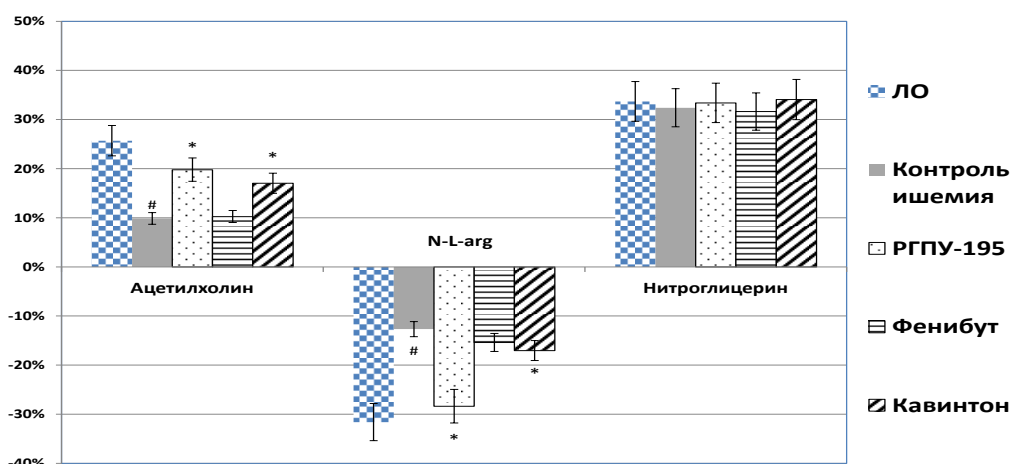


Рисунок 4. Изменение уровня мозгового кровотока при введении модификаторов синтеза оксида азота после фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных крыс.

Примечания: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО

Учитывая, что состояние головного мозга в условиях его нарушенного кровообращения сопровождается снижением потребления глюкозы тканью, активацией ПОЛ, что усугубляет негативное влияние ишемии, далее была проведена оценка влияния исследуемых соединений на данные параметры у овариэктомированных животных после ФИМ.

Лечебное введение соединения РГПУ-195 (в большей степени) и препарата сравнения – кавинтона (в меньшей степени) статистически значимо увеличивали утилизацию глюкозы мозговой тканью, что выражалось в увеличивая артериовенозной разницы в среднем на 14% и 6% соответственно, по сравнению с данными крыс контрольной группы, что может способствовать лучшей трофики головного мозга (рис.5).

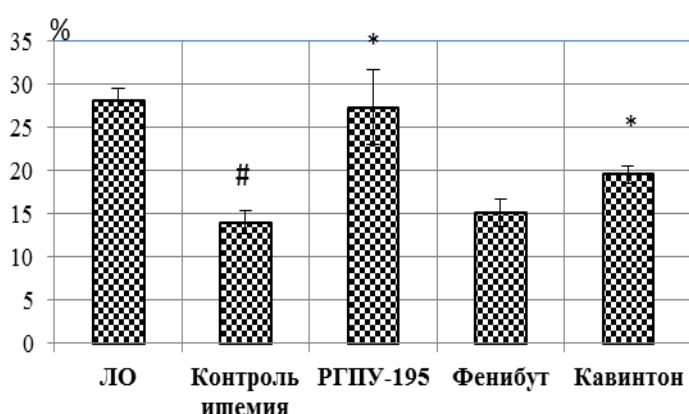


Рисунок 5. Утилизация глюкозы мозговой тканью (%) после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при фокальной ишемии головного мозга у овариэктомированных животных.

Примечания: ЛО- ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия, # – различия достоверны в сравнении с ЛО крысами ($p < 0,05$).

Применение у экспериментальных групп в течении 7 дней после операции соединения РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг, фенибута и кавинтона приводило к снижению концентрации ТБК – активных продуктов в плазме крови на 29,5%, 19%, 24,3% соответственно, относительно животных контрольной группы (рис.6).

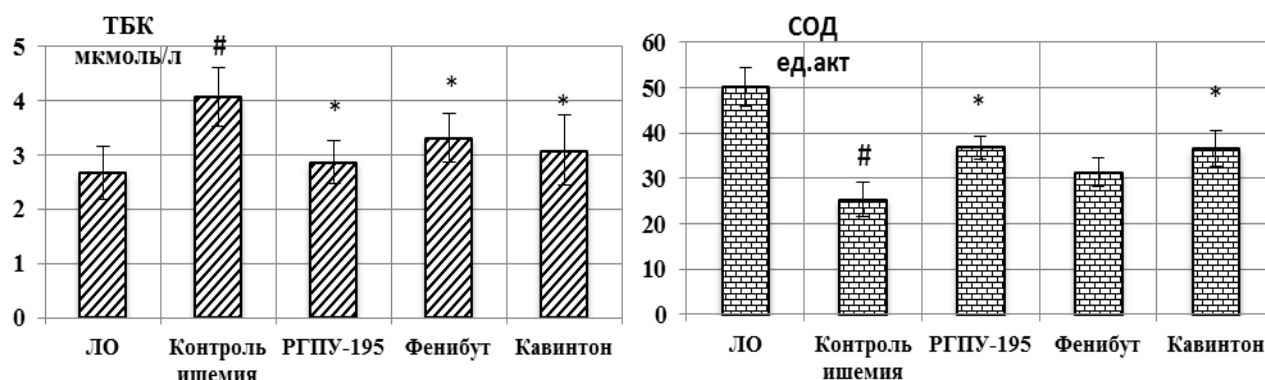


Рисунок 6. Концентрации ТБК-активных продуктов и активность СОД в плазме крови животных после моделирования фокальной ишемии головного мозга

*Примечание: # – различия статистически достоверны в сравнении с показателями ложнооперированных животных (ЛО) при $p < 0,05$; *- различия статистически достоверны в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных при $p < 0,05$*

Уровень СОД при ишемии головного мозга статистически значимо был выше в группах, получавших соединение РГПУ-195, фенибут, кавинтон, где её концентрация составила $36,87 \pm 2,53$, $31,45 \pm 3,14$ и $36,63 \pm 3,88$ соответственно, а в группе контроля – $25,4 \pm 3,68$.

Известно, что при нарушении функции эндотелия его клетки синтезируют большое количество прокоагулянтов и вазоконстрикторов, что вызывает дисбаланс в сторону увеличения сосудосуживающего и тромбогенного потенциалов. В ходе дальнейшего исследования было выявлено, что моделируемая патология приводила к нарушению как со стороны коагуляционного гемостаза, так и со стороны сосудисто-тромбоцитарного звена.

В группах, которым вводилось исследуемое соединение и препараты сравнения, степень агрегации тромбоцитов снизилась на 26% на фоне лечебного действия соединения РГПУ-195, а у препарата сравнения кавинтона – на 23% по сравнению с группой контроль-ишемия. Скорость агрегации тромбоцитов при введении соединения РГПУ-195, была ниже по сравнению с контрольной группой крыс и животными, получавшими фенибут и кавинтон на 31%, 16%, 19% соответственно.

При исследовании плазменного (коагуляционного) компонента гемостаза после моделирования фокальной ишемии в условиях гипоэстрогемии отмечалось положительное влияние исследуемого вещества – РГПУ-195, которое превосходило эффект препарата сравнения – кавинтона. Проявлялось это в удлинении АЧТВ, ТВ, ПВ и снижение уровня фибриногена по сравнению с группой контроль – ишемия (рис.7).

Таким образом, соединение РГПУ-195 способно улучшать не только вазодилатирующую функцию эндотелия, но и снижать агрегацию тромбоцитов и свёртывание крови, что важно при анализе эндотелиопротекторной активности исследуемого вещества.

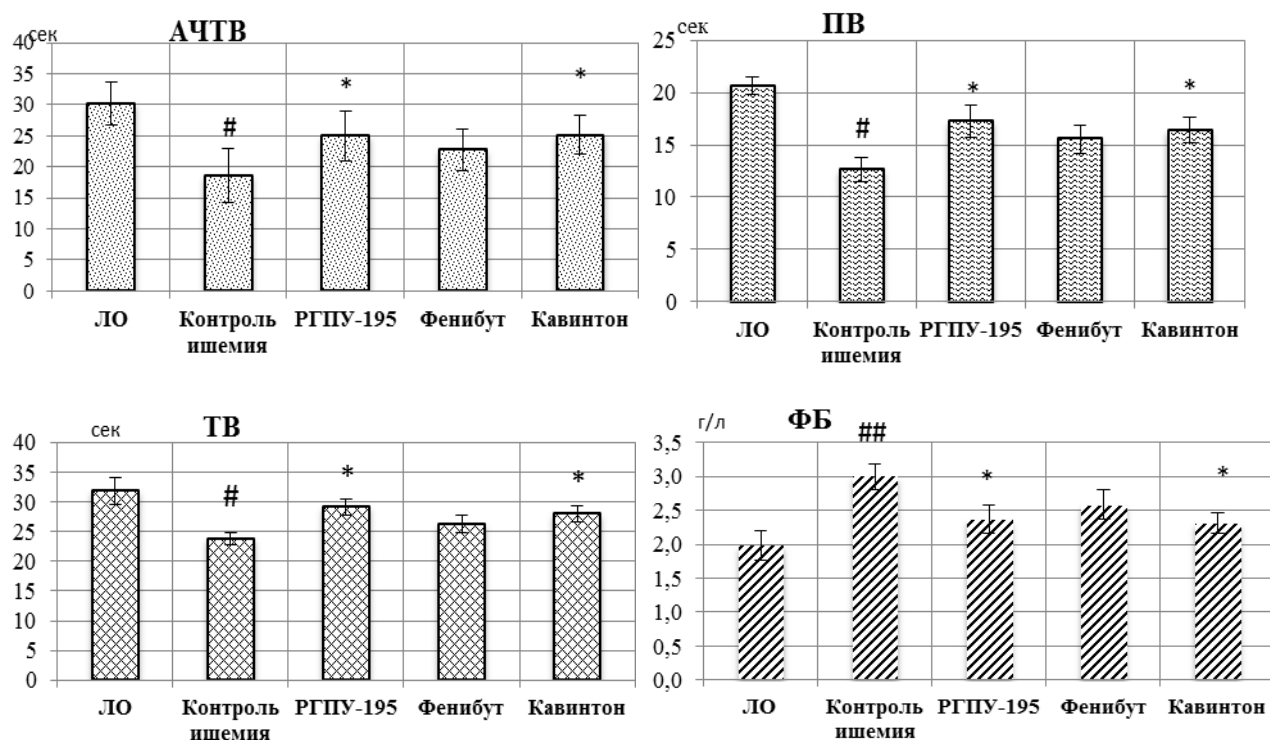


Рисунок 7. Изменение АЧТВ, ПВ, ТВ и содержание фибриногена у животных после моделирования фокальной ишемии головного мозга при введении исследуемых соединений и препаратов сравнения.

*Примечание: ЛО-ложнооперированные животные, * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой контроль-ишемия; # – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных ЛО*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате целенаправленного поиска среди 6 новых производных ГАМК и глутаминовой кислоты было выбрано соединение РГПУ-195 (β -пиридил ГАМК), проявляющее наиболее выраженное церебропротекторное действие при ишемически-реперфузионном повреждении головного мозга и в условиях необратимой окклюзии ОСА. Полученные данные согласуются с ранее выявленными церебропротекторными свойствами ГАМК (Бородкина Л. Е. 2009; Волотова Е.В. и др, 2013; Куркин Д.В., 2013; Тюренокв И. Н. и др., 2014; Литвинов А.А., 2015)

Известно, что сосудистые заболевания тесно связаны с нарушением функции эндотелия, а наиболее быстрые и тяжёлые их осложнения проявляются при гормональной патологии различного генеза (например, недостаточность половых гормонов) (Сметник В.П. и др., 2001; Collins P. et al., 2007; Denison F.C. et al., 2010). При сочетанном моделировании данных патологий у животных формировались более выраженные нарушения неврологического, моторного, поведенческого и когнитивного дефицитов, эндотелиальной дисфункции, а также повышалась агрегация тромбоцитов и свёртывание крови, снижалась активность ключевого фермента антиоксидантной системы – СОД, повышалась концентрация и накопление ТБК-активных продуктов, отмечалось снижение утилизации глюкозы

мозговой тканью. Соединение РГПУ-195 (β -пиридил ГАМК) оказывало церебро- и эндотелиопротекторное действие, невеликая отмеченные нарушения, связанные с недостаточностью мозгового кровообращения.

ВЫВОДЫ

1. При двусторонней окклюзии общих сонных артерий среди изученных ароматических производных ГАМК и глутаминовой кислот большей церебропротекторной активностью обладали соединения под лабораторными шифрами РГПУ-135 (β -фенил-ГК), РГПУ-195 (β -пиридил-ГАМК) и меньшей РГПУ-136(β -индол-ГАМК) РГПУ-202(β -толил-ГК). Соединения РГПУ-146 (парахлорфенилГК) и РГПУ-217 (паранитрофенил ГК) не оказывали церебропротекторное действие.
2. В условиях 10-ти минутной окклюзии общих сонных артерий только профилактическое применение соединения РГПУ-195 способствовало меньшему снижению МК. В постреперфузионный период явления «гиперперфузии» были менее выражены на фоне предварительного введения соединений РГПУ-135, РГПУ-202, РГПУ-195, РГПУ-136, а явление «гипоперфузии» только при предварительном применении веществ РГПУ-135, РГПУ-195.
3. При моделировании необратимой окклюзии общих сонных артерий большая выживаемость животных (на 30-35%) наблюдалась на фоне превентивного введения соединений РГПУ-135, РГПУ-202, РГПУ-195, а выраженность неврологического дефицита у выживших животных (по шкале McGrow) была меньше на фоне введения соединений РГПУ-135 и РГПУ-195; большая двигательная и ориентировочно-исследовательская активность у животных, получавших РГПУ-135, РГПУ-136, РГПУ-195, РГПУ-202, а менее выраженные нарушения памяти и более высокие показатели МК у животных, получавших РГПУ-135 и РГПУ-195.
4. Проведенный анализ зависимости «доза-эффект» установил, что наиболее выраженное церебро- и эндотелиопротекторное действие оказывает соединение РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг, и несколько меньшее соединение РГПУ-135 в дозе 26 мг/кг.
5. Курсовое 7-ми дневное лечебное введение соединения РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг животным с недостаточностью половых гормонов, перенесшим фокальную ишемию мозга, уменьшало выраженность неврологического и когнитивного дефицита, нарушений координации движений, снижения двигательной и ориентировочно-исследовательской активности.
6. Механизм церебропротекторного действия соединения РГПУ-195 в условиях фокальной ишемии головного мозга обусловлен увеличением мозгового кровотока, улучшением ЭЗВД, увеличением процента утилизации глюкозы мозгом (на 13,4%), снижением содержания

продуктов ПОЛ (МДА на 30%), повышением активности СОД (на 45%), уменьшением агрегации тромбоцитов (на 26%), снижением коагуляционного компонента гемостаза, снижением выраженности отёка головного мозга

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты фармакологических исследований соединения РГПУ-195 свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки на его основе средства для профилактики и лечения нарушений мозгового кровообращения ишемического генеза.
2. Целесообразно продолжить синтез новых производных ГАМК с ароматическими заместителями в β -положении для продолжения поиска веществ с высокой церебро- и эндотелиопротекторной активностью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Волотова Е.В., **Мазина Н.В.**, Куркин Д.В., Тюренков И.Н. Нейропротективное действие гидрохлорида β -фенилглутаминовой кислоты (РГПУ-135) при недостаточности мозгового кровообращения у крыс//**Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.** – 2013. – №1. – С. 40-42.
2. **Мазина Н.В.**, Волотова Е.В., Куркин Д.В. Нейропротекторное действие нового производного ГАМК-РГПУ-195 при ишемии головного мозга // **Фундаментальные исследования.** – 2013. – №6 (часть 6). – С.1473-1476.
3. Волотова Е.В., Куркин Д.В., **Мазина Н.В.**, Берестовицкая В.М., Васильева О.С. Сравнительный анализ влияния бета-фенильных производных глутаминовой и гамма-аминомасляной кислоты на мозговой кровоток и функциональное состояние эндотелия сосудов головного мозга животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий//**Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2013. – Т.76, №6. – С. 11-13.
4. Тюренков И.Н., Волотова Е.В., Куркин Д.В., **Мазина Н.В.**, Бакулин Д.В., Логинов И.О., Антипова Т.А. Нейропротективное и антиоксидантное действие нейроглутама при церебральной ишемии// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2015. – Т. 159, № 3. – С. 344-347.

Статьи в иных журналах и сборниках материалов конференций

1. **Мазина Н.В.** Влияние нового производного ГАМК на параметры мозгового кровотока /Н.В. Мазина, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин // 3-й

Всероссийский научно-практический семинар для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии», Волгоград – 2011. – С. 47-48.

2. Волотова Е.В. Влияние нового соединения РГПУ-217 на мозговое кровообращение в условиях ишемического повреждения головного мозга / Е.В. Волотова, **Н.В. Мазина**// БГМУ: 90лет в авангарде медицинской науке и практике: сб.науч.тр. /Белорус. гос. мед. Ун-т; редкол.: А.В. Сикорский и др. – Минск: ГУ РНМБ, 2011. – Т. 1. – 64-65.

3. Волотова Е.В. Изучение влияния двух новых производных глутаминовой кислоты на мозговой кровоток и уровень артериального давления / Е.В. Волотова, **Н.В. Мазина** // Аспирантские и докторантские чтения: Дерзания нового времени – поиск инноваций: Сборник тезисов научно-практической конференции. Москва, 8февраля 2012 г./ под ред. В.Н. Николенко и др.– М.: Изд-во Первого государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, 2012. – С. 52-53.

4. **Мазина Н.В.** Влияние нового производного глутаминовой кислоты на выживаемость животных в условиях экспериментальной ишемии головного мозга крыс /Н.В. Мазина, Е.В. Волотова// Вестник Российского государственного медицинского университета: материалы VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 15 марта 2012г.). – М.: ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, 2012. – Специальный выпуск №1 – С.270.

5. **Мазина Н.В.** Влияние нового производного ГАМК – РГПУ-195 на вазодилатирующую функцию эндотелия при экспериментальной ишемии головного мозга / Н.В. Мазина, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин// Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 70-ой открытой научно-практической конференция молодых учёных и студентов с международным участием – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2012. – С.331.

6. **Мазина Н.В.** Влияние нового производного глутаминовой кислоты на неврологический статус животных при ишемии головного мозга /Н.В. Мазина, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин// Человек и лекарство: тезисы докладов 14-го Российского национального конгресса 23-27 апреля 2012г. – Москва, 2012. – С.399-400.

7. Волотова Е.В. Изучение действия производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот при ишемии головного мозга в условиях блокады синтеза оксида азота / Е.В. Волотова, **Н.В. Мазина**, Д.А. Бакулин, Е.В. Петрова, О.Г. Шишлянникова //Казань IV Съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» 18-21 сентября 2012. – Казань 2012. – С. 38.

8. **Мазина Н.В.** Влияние производных гамма-аминомасляной кислоты на агрегацию тромбоцитов у животных с фокальной ишемией головного мозга / Н.В.Мазина, Е.В.Волотова, Д.В. Куркин // Вестник РГМУ: материалы. – 2013. – Специальный выпуск №1 – С.186.

9. Бакулин Д.А., Волотова Е.В., Куркин Д.В., **Мазина Н.В.** Влияние структурных аналогов нейроактивных аминокислот на мозговой кровоток

крыс после необратимой окклюзии общих сонных артерий при модификации синтеза оксида азота //Тезисы V МЕЖДУНАРОДНЫЙ МОЛОДЕЖНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОНГРЕСС, «Санкт-Петербургские научные чтения – 2013», 4-6 декабря 2013 г. – С.352-353.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЧТВ – активированное частично тромбопластиновое время

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГК – глутаминовая кислота

ЛО – ложнооперированные животные

МК – мозговой кровоток

НМК – нарушение мозгового кровообращения

ОСА – окклюзия общих сонных артерий

ОП – открытое поле

ФИМ – фокальная ишемия мозга

ПВ – протромбиновое время

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТВ – тромбиновое время

ТЭИ – тест экстраполяционного извлечения

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ЦЭК – циркулирующие эндотелиальные клетки

ЭД – эндотелиальная дисфункция

ЭЗВД – эндотелийзависимая вазодилатация

**Мазина
Наталья Валерьевна**

**Церебро – и эндотелиопротекторные свойства ароматических
производных ГАМК и глутаминовой кислоты при моделировании
ишемии головного мозга**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2016