

На правах рукописи

Волотова Елена Владимировна

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО
КРОВООБРАЩЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ
(В ЭКСПЕРИМЕНТЕ).

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Волгоград – 2016

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

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

Официальные оппоненты:

Мирзоян Рубен Симонович, заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией фармакологии цереброваскулярных расстройств, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Покровский Михаил Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Волчегорский Илья Анатольевич, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, Южно-Уральский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущее учреждение:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г.Томск).

Защита диссертации состоится "___" _____ 2016 г. в ___ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Автореферат разослан "___" _____ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета, доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Актуальность поиска новых средств для лечения нарушений мозгового кровообращения (НМК) обусловлена высоким удельным весом цереброваскулярных патологий в структуре заболеваемости и смертности населения, высокими показателями временной нетрудоспособности и первичной инвалидизации (Суслина З.А., 2005; Kim A.S., 2015). В настоящее время существует широкий арсенал лекарственных препаратов, рекомендованных в терапии нарушений мозгового кровообращения, однако их эффективность в полной мере не удовлетворяет требованиям клиницистов (Гусев Е.И., 2013; Данилов В.И., 2014; Макарова Л.М., 2014; Рябченко А. Ю., 2014; Bettger P.J., 2014). В доклинических исследованиях многие вещества оказываются высокоэффективными, но при клинических исследованиях они не проявляют той активности, которая регистрировалась в эксперименте (Corbett D., 1998; Röther J., 2008; Auriel E., 2010; Cook D. J., 2011; Kaur H., 2013; Moretti A., 2015; Tymianski M., 2015). С одной стороны, данный факт можно связать с тем, что нейрометаболические, функциональные и морфологические особенности нервной системы, многофакторность патогенеза, зональность и этапность ишемического повреждения головного мозга затрудняют успешное использование препаратов с нейропротекторной активностью, механизм действия которых зачастую направлен лишь на одно из звеньев ишемического каскада (Minnerup J., 2012; Kaur H., 2013; Majid A., 2014; Turner R. C., 2015; Lo E.H., 2016). Например, прямые церебровасодилататоры, антиоксиданты, антиагреганты и другие монотаргетные средства в условиях ишемических нарушений, оказались малоэффективными. С другой стороны, при разработке новых лекарственных препаратов с нейропротекторными свойствами на этапах доклинических исследований зачастую полностью исключается влияние на состояние организма в целом преморбидного фона, который в свою очередь в реальных клинических условиях предшествует и способствует развитию основного заболевания (Ankolekar S., 2012; Buga A. M., 2013; Turner R. C., 2013; Xu S., 2013; Dirnagl U., 2014; Петров В. И., 2016). Можно предположить, что изучение эффективности новых препаратов при моделировании НМК на интактных (здоровых) животных с сохраненными системами регуляции тонуса сосудов может дать более выраженный фармакологический эффект, чем у животных с сопутствующими патологическими состояниями и, в частности, с выраженными нарушениями эндотелиальной системы. В реальных клинических условиях выбор оптимального метода лечения конкретного больного базируется не только на особенностях патологического процесса, но и на знании соматического состояния пациента до развития недостаточности мозгового кровообращения, что зачастую приводит к комбинированию нескольких лекарственных средств. В этой связи, очевидно, что стратегия поиска и разработки новых эффективных средств

для профилактики и лечения острых и хронических НМК должна базироваться на иной методологии, учитывающей терапевтический потенциал наиболее активных веществ по наличию поливалентного механизма действия.

Степень научной разработанности проблемы

В последние годы среди ведущих факторов, обуславливающих течение, исход и развитие осложнений у больных с НМК, большое внимание отводится эндотелиальной дисфункции (ЭД), связанной нарушением равновесия между факторами, вызывающими вазодилатацию, антитромботическое, противовоспалительное, антипролиферативное действие и факторами, оказывающими сосудосуживающее, тромбогенное, провоспалительное и пролиферативное действие (Смирнов И.Е., 2010; Гусев Е.И., 2015; Олешко Т. Б., 2015; Хохлов А.Л., 2015; Воробьева Е.Н., 2016). По мнению многих исследователей при продолжительном нарушении структуры и функций эндотелиальной системы, она начинает играть ключевую роль в патогенезе практически всех сердечно-сосудистых заболеваний (Cannon R.O., 1997; Furchgott R.E., 1998; Лупинская З.А., 2003; Герасимов А. А., 2015; Федин А. И., 2015; Matsuzawa Y., 2015; Gimbrone M. A., 2016). Поэтому в настоящее время НМК рассматриваются в тесной связи с ЭД, которая может быть причиной или следствием атеросклероза, артериальной гипертензии, сахарного диабета (СД), недостаточности половых гормонов (НПГ), возрастных изменений и др., и является мишенью для фармакотерапии этой патологии (Танашян М.М., 2008; Гусев Е.И., 2009; Mandosi E., 2015; Matsuzawa Y., 2015; Gimbrone M. A., 2016). На основании изложенного в настоящее время существует несомненный интерес к эндотелиальной системе как мишени для таргетной терапии НМК, поэтому представлялось целесообразным разработать новую методологию поиска средств коррекции цереброваскулярных заболеваний и изучить эффективность ряда новых соединений при недостаточности мозгового кровообращения, моделируемой в условиях ЭД.

Цель исследования – разработать новую методологию поиска средств фармакологической коррекции нарушений мозгового кровообращения (НМК) и на ее основе осуществить среди четырех химических рядов выбор высокоактивных соединений с церебро- и эндотелиопротекторной активностью, перспективных для профилактики и лечения цереброваскулярных заболеваний.

Задачи исследования:

1. Обосновать и разработать новую методологию поиска средств для фармакологической коррекции НМК.
2. Провести в ряду производных ГАМК, глутаминовой кислоты, амидов глуксисбензойной кислоты, хиназолинов целенаправленный поиск веществ, обладающих выраженными церебро- и эндотелиопротекторными свойствами при острых НМК, моделируемых перманентной двусторонней окклюзией общих

сонных артерий, сравнив их эффективность с клинически апробированными препаратами (магнием сульфатом, кавинтоном, цитиколином).

3. Провести сравнительный анализ эффективности фармакологической коррекции наиболее активными соединениями НМК и эндотелиальной дисфункции различного генеза (гипоэстрогениндуцированной, вызванной экспериментальным сахарным диабетом, возрастными изменениями сосудов).

4. Изучить церебропротекторные свойства наиболее активных соединений при хронических НМК, вызванных 28-ми дневным гравитационным воздействием.

5. Исследовать влияние преморбидного фона (изменений в иммунном статусе, стресса, возрастных особенностей) на выраженность неврологических нарушений, поведение, координацию, когнитивный дефицит, изменения содержания маркеров повреждения мозга (NSE, MBP, BDNF) у животных с НМК, получавших наиболее активные соединения.

6. Изучить механизм эндотелиопротекторного действия наиболее активных соединений у животных с нарушениями мозгового кровообращения в условиях эндотелиальной дисфункции по их влиянию на содержание количество циркулирующих эндотелиоцитов, фактора фон Виллебранда, состояние антитромботической и противовоспалительной функций эндотелия, а также *in vitro* по влиянию – на продукцию NO эндотелиальными клетками.

7. Изучить влияние наиболее активных веществ на содержание продуктов ПОЛ, активность ферментов АОС, их метаболические эффекты, коагуляционный гемостаз.

8. На основании сравнительного анализа действия изучаемых соединений на мозговое кровообращение в условиях экспериментально вызванной патологии и эндотелиальной дисфункции выделить высокоэффективные вещества, перспективные для разработки на их основе лекарственных средств, и предложить рекомендации по фармакологической коррекции нарушений мозгового кровообращения с учетом преморбидного фона, возрастных различий.

Научная новизна работы

Разработана и апробирована новая методология целенаправленного поиска веществ с церебропротекторным действием при различных НМК, базирующаяся на поэтапном изучении: первоначально на моделях ишемии головного мозга, воспроизводимых на условно здоровых животных, а на втором этапе – наиболее активные вещества изучались на животных с преморбидными состояниями (СД, НПГ, возрастными изменениями, различными состояниями иммунитета), сопровождающиеся ЭД, одним из основных патогенетических факторов, лежащих в основе практически всех сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе НМК.

Впервые выполнено сравнительное комплексное изучение церебро- и эндотелиопротекторных свойств 4-х различных химических рядов соединений

(производных ГАМК, глутаминовой кислоты, амидов глуксидбензойных кислот, хидазолина) на животных без и с отягощенным преморбидным фоном. Показано их неоднозначное церебро- и эндотелиопротекторное действие при НМК, протекающих на фоне СД, НПГ, различных состояний иммунной системы.

Впервые при НМК в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной сахарным диабетом, гипозэстрогемией, возрастными изменениями выявлена высокая церебро- и эндотелиопротекторная активность фенильного производного глутаминовой кислоты (РГПУ-135), пиридинового производного ГАМК (РГПУ-195), композиции фенибута и салициловой кислоты (РГПУ-189), композиции мефебута и L-аргинина (РГПУ-260).

Впервые установлено повышение активности e-NOS, базальной и стимулируемой продукции NO эндотелиальными клетками, снижение количества циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, повышение утилизации глюкозы мозгом, снижение агрегации тромбоцитов и продуктов ПОЛ, повышение активности антиоксидантной системы у животных с НМК на фоне ЭД под влиянием соединений РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-135, РГПУ-260, что очевидно лежит в основе их церебропротекторного действия и делает перспективными для дальнейшей разработки в качестве препаратов для профилактики и лечения НМК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанная методология поиска новых средств для лечения цереброваскулярных заболеваний при моделировании острых и хронических НМК в условиях отягощенного преморбидного фона дает возможность оценить церебро- и эндотелиотропные свойства соединений в условиях, более приближенных к клинической ситуации, чем это моделируется сегодня и позволит с большей вероятностью экстраполировать результаты доклинических исследований на клиническую практику. Проведенный анализ полученных данных об эффектах новых церебропротекторных средств – производного глутаминовой кислоты (РГПУ-135), производных ГАМК (РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) в условиях острых и хронических НМК доказывает их неодинаковую активность у животных с различным преморбидным фоном. Это позволит в последующем при создании на их основе препаратов для лечения определенных цереброваскулярных заболеваний более дифференцированно проводить клиническое изучение, учитывающее имеющиеся патологии пациентов.

Методология и методы диссертационного исследования

Работа носила экспериментальный характер, выполнена на двух видах лабораторных грызунов (крысы и мыши). На каждом этапе исследования при распределении животных были сформированы не менее двух контрольных групп (интактные и с экспериментальной патологией, которым вводился только физиологический раствор в дозе и объеме, эквивалентном получаемым опытными группами). Экспериментальные модели патологий были выбраны в соответствии с

методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств (Хабриев Р.У., 2005; Спасов А.А., 2010; Миронов А.Н., 2012). Используемое в работе технологическое оборудование ВолгГМУ, НИИ фармакологии ВолгГМУ являлось специализированным и позволяло выполнить поставленные задачи. Методы статистического анализа полученных результатов соответствовали рекомендованным для проведения доклинических исследований. При разработке новой методологии поиска лекарственных препаратов для лечения и профилактики НМК использован концептуальный подход, предполагающий предварительную разработку концепции исследования, с последующим апробированием ее на этапе доклинического изучения наиболее активных соединений у животных с нарушенным преморбидным фоном.

Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол №156-2012 от 6.04.2012г.

Реализация результатов исследования

На основании данных, полученных в ходе диссертационного исследования, предложена дальнейшая программа целенаправленного поиска соединений с церебро- и эндотелиопротекторными свойствами среди производных хиназолинов (кафедра фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России), гиброксibenзойных кислот (кафедра химии ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России), ГАМК, глутаминовой кислоты (кафедра органической химии Российского Государственного Педагогического Университета им. А.И. Герцена (г. Санкт-Петербург)).

Разработанная новая методология поиска и доклинического фармакологического изучения веществ для коррекции НМК используется в научно-исследовательской работе кафедры фармакологии и биофармации ФУВ Волгоградского государственного медицинского университета (ВолгГМУ), НИИ фармакологии ВолгГМУ, кафедре фармакологии ВолгГМУ.

Полученные результаты об эндотелиопротекторных свойствах новых производных ГАМК, глутаминовой кислоты гиброксibenзойных кислот, хиназолина включены в раздел учебных программ курса фармакологии на кафедрах фармакологии и биофармации ФУВ, фармакологии, клинической фармакологии и интенсивной терапии ВолгГМУ. Материалы работы оформлены в виде информационных писем, которые используются в учебном процессе и научной работе кафедры фармакологии ВолгГМУ, фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии ВолгГМУ. По материалам настоящей работы получены 4 патента Российской Федерации на изобретение, поданы 2 заявки на получение патентов Российской Федерации в Роспатент.

Полученные результаты об изучении церебро- и эндотелиопротекторных свойств амидов бензойных кислот и производных ГАМК и глутаминовой кислоты составили основу для выполнения двух государственных заданий (номера государственных регистраций 115042410205, 115042410206) по проведению доклинических исследований средства для коррекции НМК.

Часть диссертации выполнена в рамках доклинических исследований нового средства, повышающего активность эндотелиальной NO-синтазы, разрабатываемого по государственному контракту с Минпромторгом РФ № № 14411.2049999.19.050 от 15 августа 2014 года на выполнение научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы (НИОКР) «Доклинические исследования лекарственного средства, повышающего активность эндотелиальной NO - синтазы», шифр «2.1 Синтаза 2014», заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (утвержденной постановлением правительства РФ от 17.02.2011 г. № 91).

Положения, выносимые на защиту

1. Выполненное исследование показало, что действие исследуемых веществ в значительной степени зависит от имеющегося преморбидного фона (НПГ, СД, состояния иммунной системы, стресса, возрастных особенностей) у экспериментальных животных. Так вещества VMA10-17, VMA13-15, C18, C40, РГПУ-151, РГПУ-152, оказывающие выраженное церебропротекторное действие при окклюзии сонных артерий на условно-здоровых животных, оказались малоэффективными при моделировании НМК на фоне сопутствующей патологии (СД, НПГ). Курсовое введение соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 животным, перенесшим НМК при экспериментальном СД, НПГ, приводило к повышению выживаемости крыс, уменьшению неврологических нарушений, улучшению вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия.

2. Среди производных ГАМК, глутаминовой кислоты, амидов гидроксibenзойной кислоты, хиназолинов наиболее выраженным церебро- и эндотелиопротекторным действием обладают соединения РГПУ-135 (фенильное производное глутаминовой кислоты), РГПУ-195 (пиридиловое производное ГАМК), РГПУ-189 (композиция фенибута с салициловой кислотой), РГПУ-260 (композиция мефебута с L-аргинином). Церебро- и эндотелиопротекторное действие РГПУ-135 не зависит от состояния иммунной системы, в равной степени выражено при интактном, стимулируемом, подавленном иммунитете. Соединение РГПУ-189 и РГПУ-135 оказывают выраженное церебро- и эндотелиопротекторное действие при эндотелиальной дисфункции вызванной стрессорным воздействием и возрастными изменениями сосудистой системы, РГПУ-195 – при хроническом НМК.

3. Механизм эндотелиопротекторного действия РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 заключается в повышении активности эндотелиальной NO-синтазы, увеличении базальной и стимулируемой продукции NO, повышении вазодилатирующей, антитромботической и противовоспалительной функций эндотелия.

4 Представленные данные свидетельствуют о необходимости пересмотра методологии поиска и разработки препаратов для профилактики и лечения НМК и проведения исследований фармакологической активности новых средств при моделировании цереброваскулярных заболеваний в условиях отягощенного преморбидного фона. Проведенное сравнительное изучение 4х химических рядов соединений позволяет говорить о том, что выраженность церебро- и эндотелиопротекторного действия веществ при НМК зависит от исходного состояния животных и наличия у них сопутствующей патологии.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность экспериментальных данных обеспечивалась применением современных методов исследований и валидированных экспериментальных моделей, с использованием высокотехнологичного оборудования, кондиционностью химических, биологических материалов и лабораторных животных, величиной экспериментальных выборок. Анализ данных и их обобщение проведены с применением методов математической статистики и прикладной математики, соответствующих характеру данных и задачам экспериментов. Все выявленные закономерности, эффекты, обобщения и выводы подтверждались результатами статистического анализа.

Основные материалы диссертации были представлены на международной научной конференции «Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)» (Ярославль, 2009), 69-й и 70-й открытой научно-практической конференция молодых учёных и студентов с международным участием (Волгоград, 2011, 2012), 2-ом, 3-м, 4-м, 5-м Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии» (Волгоград, 2010, 2011, 2012, 2013), научно-практической конференции, посвященной 90-летию учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (Минск, 2011), научно-практической конференции «Аспирантские и докторантские чтения: дерзания нового времени – поиск инноваций» (ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва 2012), VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2012), 14-м Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012), IV Съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), V международном молодежном медицинском конгрессе, «Санкт-Петербургские научные чтения – 2013» (Санкт-Петербург, 2013), Всероссийской конференции

«Фармакологическая нейропротекция», посвященная 90-летию отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова (Санкт-Петербург, 2013), 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2015), научно-практической конференции с международным участием «Деадаптация различного генеза и пути её фармакологической коррекции» (Пятигорск, 2015).

Публикации.

По результатам диссертационной работы опубликовано 42 научные работы: 20 научных статей в рецензируемых изданиях перечня ВАК Министерства образования и науки РФ, 18 работ в материалах симпозиумов и научных конференций, 4 патента РФ. Получено 2 приоритетные справки на поданные заявки.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 344 страницах машинописного текста, иллюстрирована 83 таблицами, 80 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VIII), обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, который включает 448 источника, из них отечественных 150, иностранных 298.

Личный вклад автора.

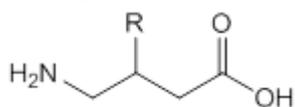
Автору принадлежит основная роль в обосновании и выборе направлений исследований, планировании и проведении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов, написании статей, докладов, тезисов и подготовке к их публикации в научных изданиях, докладах и обсуждении на отечественных и международных конференциях. В экспериментальных работах, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим, состоящим в участии на всех этапах – от постановки задач и выполнения, обработки, полученных данных, до оформления результатов в виде отчетов, публикаций и докладов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

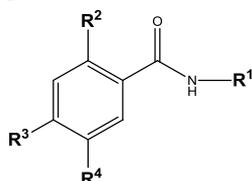
В главе 1 представлен литературный обзор исследований, посвященных проблеме поиска и разработки новых лекарственных препаратов для лечения и профилактики нарушений мозгового кровообращения. Дана характеристика основных зарегистрированных нейропротекторных препаратов, описан их терапевтический потенциал. Обоснована необходимость пересмотра существующей методологии поиска новых потенциальных препаратов на этапе доклинической разработки. Предложена новая концепция поиска и изучения средств для лечения и профилактики цереброваскулярных заболеваний, учитывающая преморбидный фон, который зачастую связан с развитием и прогрессированием эндотелиальной дисфункции.

В главе 2 описаны материалы и методы, использованные для проведения исследований. Исследование проведено на 2586 крысах обоего пола (самцах и

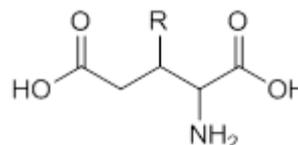
самках) трех возрастных групп (6-ти, 12-ти, 24-х месяцев), 360 мышах массой 18-22 г, содержащихся в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Эксперименты проводились в соответствии с Приказом Минздрава (Минздравсоцразвития) России о надлежащей лабораторной практике, ГОСТом Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики, Рекомендациям ВОЗ, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)». Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (ONHRP), протокол №154-2012 от 6.04.2012г. Животные были получены из филиала «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН (Московская обл.), ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»» РАМН (Ленинградская область), ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России) (г. Волгоград) и содержались с учетом правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).



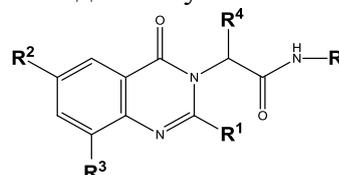
Производные ГАМК*



Амиды бензойной кислоты†



Производные глутаминовой кислоты*



Хиназолиновые производные‡

Рис. 1. Общие структуры исследуемых соединений.

В работе изучена церебропротекторная активность 4-х химических рядов соединений: производные ГАМК; глутаминовой кислоты; производные хиназолина; амиды гидроксibenзоновых кислот. Исследуемые вещества на этапах скрининга были изучены в дозах, составляющих от 1/30 до 1/10 от Мг (молекулярной массы), растворялись в физиологическом растворе *ex tempore!* и вводились внутривенно в объеме 0,1 мл раствора на 100 г веса крысы. Во всех экспериментальных сериях животные контрольных групп получали 0,9% раствор NaCl в объеме 0,1 мл на 100 г веса. Для веществ с высокой активностью первоначальные дозы были кратно увеличены/уменьшены в 2 и 4 раза. На этапе

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

† Выражаем искреннюю благодарность зав. кафедрой химии ВолгГМУ, д.х.н., проф. Брелю А.К., к.х.н., доц. Лисиной С.В. и всем сотрудникам кафедры за предоставленные для исследования вещества

‡ Выражаем искреннюю благодарность зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ, д.х.н., проф. Озерову А.А. и всем сотрудникам кафедры за предоставленные для исследования вещества

моделирования НМК на животных с отягощенным преморбидным фоном, различным состоянием иммунной системы исследуемые соединения вводились в дозах, оказывающих наиболее выраженный церебро- и эндотелиопротекторный эффект на этапе скрининга.

В качестве препаратов сравнения на различных этапах исследования были использованы: фенибут 25 мг/кг (получен на кафедре органической химии РГПУ им. А.Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия), кавинтон 3,8 мг/кг (Gedeon Richter, Венгрия), цитиколин 500 мг/кг (Ferrer Internacional S.A., Испания), глиатилин 100 мг/кг (Italfarmaco, Италия), магния сульфат 300 мг/кг (Биохимик, Россия), церебролизин 2,5мл/кг (EVER Neuro Pharma GmbH, Австрия).

Первичный скрининг церебро- и эндотелиопротекторной активности соединений был проведен на условно здоровых животных, у которых моделировали НМК путем одномоментной окклюзии общих сонных артерий (ОСА). О церебро- и эндотелиопротекторном действии веществ судили по их способности влиять на выживаемость животных, развитие неврологических нарушений (по шкале McGraw), состояние мозгового кровообращения (МК) и вазодилатирующую функцию эндотелия. МК оценивали с помощью ультразвуковой флоуметрии на доплерографе «Минимакс-Допплер-К» (ООО «СП-Минимакс», г. Санкт-Петербург). Вазодилатирующую функцию эндотелия мозговых сосудов изучали, используя методический подход, предложенный Тюренковым И.Н., Воронковым А.В. (2008), который заключался в оценке изменений уровня мозгового кровотока в ответ на введение различных модификаторов синтеза эндогенного оксида азота (NO).

Далее были выбраны наиболее активные соединения, изучена зависимость выраженности церебропротекторного действия от используемой дозы, сопоставлена их активность с препаратами сравнения.

На следующем этапе исследования эффективность соединений лидеров изучалась на животных с фокальной ишемией головного мозга, имеющих одно из возможных экспериментально вызванных преморбидных состояний (недостаточность половых гормонов или сахарный диабет). Моделирование фокальной ишемии головного мозга у крыс производили необратимой окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) путем внутрисосудистого введения нейлоновой нити через внутреннюю сонную артерию на глубину перекрывающую устье отхождения средней мозговой артерии (Iaci J.F., 2010). В качестве анестезии использовался хлоралгидрат в дозе 350 мг/кг. Недостаточность половых гормонов (НПГ), как экспериментальная модель ЭД, вызывалась путем экстирпации матки с придатками у самок крыс, массой 180-210 гр., в возрасте 4-6 месяцев (Робертус А.И, 2010; Воронков А.В., 2011). Негенетическую модель СД 2 типа моделировали на животных путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина в дозе 65 мг / кг на фоне предварительного введения никотинамида в дозе 230 мг/кг

(Спасов А.А., 2011). За 7 (при СД) или 28 дней (при НПГ) до окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) моделировалась соответствующая патология. После ОСМА животным в течение 7 дней вводились исследуемые соединения и препараты сравнения, проводилась оценка их неврологического состояния (шкалы McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной (1996), 9-бальная шкала Combs и D'Alecy (Combs D.J., 1987) и шкала Garcia (Garcia J.H., 1995), ОП, ТЭИ, УРПИ, тест лестница («Staircase test»), сужающаяся дорожка), на завершающем этапе оценивали состояние МК, вазодилатирующую функцию эндотелия, размеры зоны инфаркта мозга с количественной оценкой размера некроза по анализу цифровых фотографий окрашенных срезов мозга (Brait V. H., 2010).

Далее наиболее активные соединения были изучены в условиях хронического НМК, которое моделировалось 28-ми дневным гравитационными перегрузками у животных в каудокраниальном векторе. Критерии эффективности были такими же, как и при острых НМК. Дополнительно для анализа когнитивных нарушений и глубины дефицита использовался радиальный 8-лучевой тест, для оценки уровня тревожности животных – приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ).

На следующем этапе исследования НМК моделировалось у старых животных. Выраженность эндотелиопротекторного действия наиболее активных веществ также оценивалось при стрессорном воздействии на животных двух возрастных групп (12 и 24-х месяцев). Стрессирование проводили в течение 6-ти дней (ежедневно по 30 мин) путем воздействия нескольких факторов – иммобилизации, кратковременно возникающих: резкого громкого звука, пульсирующего света и покачивания, порядок воздействия которых выбирался случайным образом (Тюренок И.Н., 2013). Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно за 1 час до стресса на протяжении 6 дней. У животных до и после стрессорного воздействия оценивался уровень АД, двигательная и ориентировочно-исследовательская активность в тесте ОП, когнитивные функции в тесте УРПИ. На завершающем этапе определяли уровень МК, концентрацию VCAM-1, IL-6, C-реактивного белка, извлекали головной мозг для морфологического и иммуногистохимического исследования §.

Далее было изучено влияние состояния иммунной системы на эффективность церебропротекции изучаемыми соединениями при НМК. Для подавления иммунной системы (ИС) животным вводили циклоспорин в дозе 5 мг/кг (торговое название «Экорал», IVAX Pharmaceuticals, Чешская Республика) (Roman W.P.; 1980, Zijlstra G.S., 2009), для активации ИС – «Пирогенал» (Медгамал, филиал ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия) в дозе 10 мкг/кг. НМК моделировали путем необратимой поэтапной билатеральной окклюзии

§ Исследование выполнено совместно с сотрудниками кафедры патологической анатомии ВолГМУ, за что выражаем искреннюю благодарность зав. кафедрой, д.м.н., проф. А.В. Смирнову, к.м.н. М.В. Шмидт, М.Р. Эковой.

общих сонных артерий. О церебропротекторном действии исследуемых соединений судили по их влиянию на выживаемость животных с НМК, развитие у них неврологического дефицита (шкала McGraw, тест Rota-rod, ОП), сохранности мозгового кровообращения, процента гидратации мозговой ткани, содержание нейронспецифических белков и нейтрофинов (NSE, MBP, BDNF), которые определялись методом ИФА с использованием специфичных наборов («Cusabio-Rat», Китай).

На завершающем этапе исследований изучены различные механизмы действия соединений лидеров (влияние на антитромботическую, противовоспалительную функции эндотелия, состояние процессов ПОЛ и антиоксидантной системы).

Антитромботическая функция эндотелия изучалась по скорости образования тромба при аппликации хлорида железа (III) на адвентицию сонных артерий животных (Kurz K.D., 1990), противовоспалительную – по содержанию С-реактивного белка.

Влияние соединений на показатели клеточного (сосудисто-тромбоцитарного) гемостаза оценивали по АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по методу Born G.(1962) в модификации Габбасова З.А. и соавт. (1989), плазменного (коагуляционного) гемостаза – по активированному частичному тромбопластиновому времени (АЧТВ), протромбиновому времени, тромбиновому времени, концентрации фибриногена и Фактора Виллебранда в плазме.

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

Для определения продукции NO эндотелиальными клетками и анализ фосфорилированных форм eNOS проводили идентификацию эндотелиальных клеток с помощью иммуногистохимического маркера эндотелиальных клеток - белка адгезии эндоглина (CD105). Продукцию NO оценивали по методу Грисса с использованием растворов 1%-ного сульфаниламида и 0.1%-ного N-(1-нафтил)-этилендиамина, приготовленных в 2,5%-ной ортофосфорной кислоте. Эффект исследуемого соединения оценивали после 1 часа инкубации клеток HUVEC. Фосфорилированные формы eNOS выявляли методом вестерн-блота с первичными кроличьими моноклональными антителами к eNOS, фосфорилированной по Ser1177 или Thr496 (Life technologies), и вторичными - Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), конъюгированными со щелочной фосфатазой**.

Потребление глюкозы головным мозгом определялось разницей концентраций глюкозы в артериальной и венозной крови. Определение содержания

** Исследование выполнено совместно с сотрудниками кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии ВолгГМУ, за что выражаем искреннюю благодарность зав. кафедрой, д.м.н., проф. Островскому О.В., д.б.н., проф. Дудченко Г.П., к.х.н., доц. Веровскому В.Е., к.ф.н., ст. преп. Зыковой Е.В.

глюкозы проводили глюкозооксидазным методом (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982).

Концентрацию ТБК-активных продуктов определяли по образованию окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) с тиобарбитуровой кислотой, с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия). Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) проводили по методу В.А. Костюк (1990).

Острую суточную токсичность при однократном введении изучали на мышах. Соединения вводили животным внутривентриально в различных возрастающих дозах однократно.

Статистическая обработка результатов исследования в зависимости от характера данных проводилась с помощью критерия Ньюмена-Кейлса (если данные подчинялись нормальному распределению), для выявления различий между двумя группами использовался критерий Мана-Уитни, между несколькими группами – Краскела-Уоллиса, затем для множественного сравнения групп между собой использовался критерий Данна (в случае принадлежности данных к ненормальному распределению) (Гланц С., 1988; Реброва О.Ю., 2002).

В главе 3^{††} представлены результаты целенаправленного поиска среди 4-х химических рядов соединений веществ с церебро- и эндотелиопротекторной активностью. Установлено, что большей протективной активностью обладают следующие соединения: среди производных фенибута с органическими биологически активными кислотами – РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189, РГПУ-258, среди композиций мефебута – РГПУ-260, среди производных ГАМК – РГПУ-195, среди производных глутаминовой кислоты – РГПУ-135; среди производных хиназолина – VMA10-15, VMA10-17, VMA13-15, VMA13-17; среди производных амидов бензойной кислоты – С4, С18, С40. Далее было проведено сравнительное изучение церебро- и эндотелиотропного действия соединений- лидеров в наиболее эффективных дозах (по результатам скрининга) с клинически апробированными препаратами (магнием сульфатом, кавитноном, цитиколином) при моделировании острого НМК. Отмечено, что практически все соединения, выбранные как наиболее перспективные, оказывали церебро- и эндотелиопротекторное действие на животных с окклюзией ОСА без отягощенного преморбидного фона, что отражалось в их влиянии на выживаемость животных в условиях ОСА, динамику развития неврологического дефицита, уровень локального мозгового кровотока в проекции средней мозговой артерии и его изменении в ответ на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина у животных после двусторонней окклюзии общих сонных артерий (табл.1).

^{††} Исследования выполнены совместно Куркиным Д.В., Мазиной Н.В.

Таблица 1

Показатели животных через 72 часа после окклюзии ОСА, получавших исследуемые соединения и препараты сравнения.

Группы животных	N	Выживаемость, %	Неврологический дефицит, баллах	Уровень МК, у.е.	Введение ацетилхолина % прироста	Введение нитро-L-аргинина % прироста
ЛО	10	100	0	4,4±0,1	30,5±2,1	-36,3±0,7
Контроль-ишемия	20	35	8,8±0,4	2,5±0,2*	11,4±0,9*	-14,1±0,7*
VMA10-15	10	70	6,4±0,9	3,2±0,4	22,3±1,2#	-15,9±0,7
VMA10-17	10	80 [#]	5,9±0,9 [#]	3,4±0,1#	23,3±1,5# [^]	-24,8±2,1# [^]
VMA13-15	9	78 [#]	5,8±0,9	3,6±0,4#	26,7±1,3# [^]	-26,5±0,8# [^]
VMA13-17	8	75	5,8±1,2	3,5±0,2#	25,5±1,8#	-21,2±5,4
C4	11	64	6,0±1	3,5±0,2#	20,3±1,9	-21,2±1,8
C18	11	82 [#]	5,6±0,8 [#]	3,6±0,3#	21,7±1,9#	-22,3±1,5#
C40	11	82 [#]	4,1±0,9 [#]	3,8±0,2#	25,6±1,5# [^]	-26±1,2# [^]
РГПУ-151	11	82 [#]	5,2±0,9 [#]	4,3±0,4# [^]	23,6±1,3# [^]	-27±0,9# [^]
РГПУ-152	11	73 [#]	5,9±0,8 [#]	4,1±0,3# [^]	24,5±1,1# [^]	-28±0,9# [^]
РГПУ-189	11	82 [#]	5,3±0,8 [#]	4,3±0,1# [^]	22,6±1,0#	-26,7±0,9# [^]
РГПУ-258	11	64	6,1±1	4,0±0,5#	18,2±0,6	-23,7±1#
РГПУ-260	11	73 [#]	5,6±0,9 [#]	3,5±0,3#	31,2±1,7# ^{^!}	-33±0,7# [^]
РГПУ-195	11	73 [#]	5,2±1 [#]	3,3±0,3#	25,6±1,3# [^]	-29,9±0,5# [^]
РГПУ-135	11	73 [#]	5,7±0,9 [#]	3,3±0,2#	24,8±0,5# [^]	-26,5±0,7# [^]
Магния сульфат	11	64	6,4±0,9	2,9±0,1	17,3±1,0	-18,9±0,7
Кавинтон	11	73 [#]	5,3±1 [#]	4,3±0,3	23,2±1,9#	-29±0,7# [^]
Цитиколин	11	82 [#]	4,2±1 [#]	4,4±0,2	27,1±0,4# [^]	-31±0,8# [^]

Примечание: * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ЛО группой; # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших магния сульфат; ! - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон.

Однако, стоит обратить внимание, что из всех соединений наиболее выраженным протективным действием обладали следующие: РГПУ-151 (композиции фенибута с никотиновой кислотой) в дозе 50 мг/кг, РГПУ-189 (композиции фенибута с салициловой кислотой) в дозе 30 мг/кг, РГПУ-152 (композиции фенибута с глутаминовой кислотой) в дозе 50 мг/кг, РГПУ-260 (композиция мефебута с L-аргинином) в дозе 5,5 мг/кг, РГПУ-135 (β- фенильное производное глутаминовой кислоты) в дозе 26 мг/кг, РГПУ-195 (β- пиридил ГАМК) в дозе 44 мг/кг, С18 (4-(N-салицилоил)аминобутановая кислота) в дозе 4 мг/кг, С40 (каливая соль N-(п-ацетоксибензоил)глицина) в дозе 4,5 мг/кг, VMA10-17(3-[2-(1-Нафтиламино)-2-оксоэтил]-6-бромхиназолин-4(3H)-он) в дозе 10 мг/кг, VMA13-15 (N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин) в дозе 5 мг/кг,

которые оказывали равное с кавинтоном и цитиколином церебро- и эндотелиопротекторное действие, превосходя по активности магния сульфат.

Глава 4.^{‡‡} В данной главе представлены исследования церебро- и эндотелиопротекторного действия соединений-кандидатов при моделировании НМК в условиях отягощенного преморбидного фона (сахарного диабета, НПГ, возрастных изменений). Установлено, что у животных, перенесших фокальную ишемию на фоне гипоэстрогемии и СД, наблюдались более выраженные неврологические отклонения, а именно нарушения координации движений, способности к выполнению моторной деятельности передних и задних конечностей, что приводило к снижению баллов по шкале Combs (рис.2). Наименьшие неврологические нарушения и, соответственно, наибольшие значения баллов имели группы животных, получавших РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260 (рис.2), что говорит о лучшей моторике и координации движений у этих животных после ОСМА. Более низкие значения медиан были отмечены в группах животных, получавших VMA10-17, VMA 13-15, C18, РГПУ-151, 152, магния сульфата.

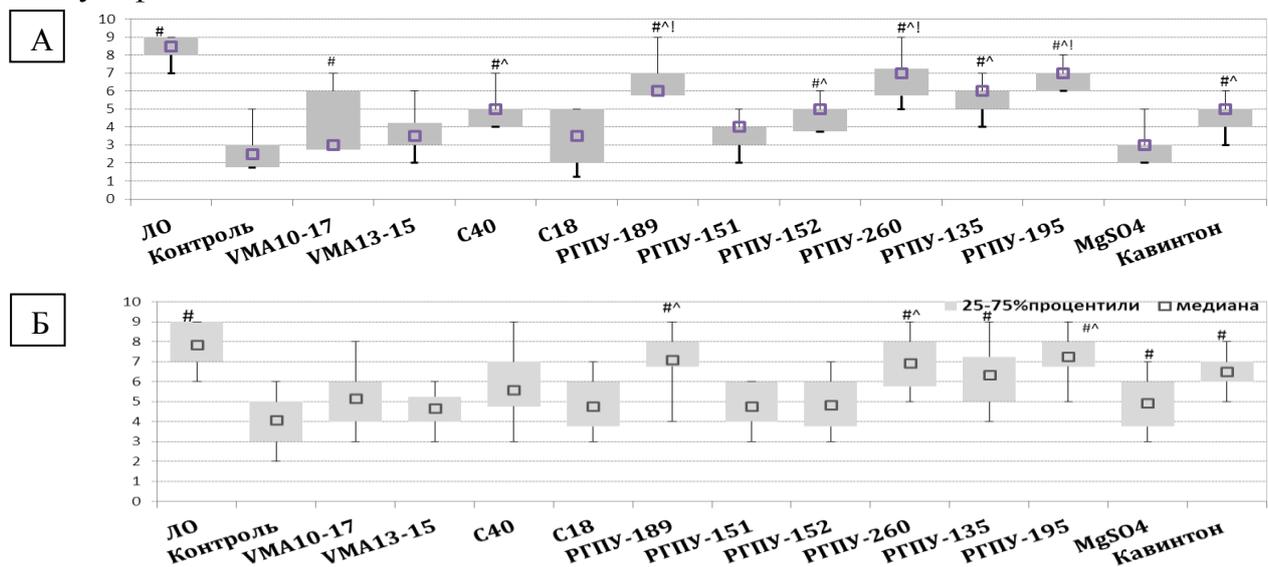


Рис. 2. Выраженность неврологического дефицита по шкале Combs (баллах) у животных через 7 суток после моделирования ОСМА на фоне недостаточности половых гормонов (А) и сахарного диабета (Б).

Обозначения: # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой животных; ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших магния сульфат; ! - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон.

Наличие моторной дисфункции также подтвердилось в тестах суживающейся дорожки и лесенки. Так в сравнении со значениями группы ЛО, крысы, перенесшие ОСМА, совершали большее количество соскальзываний задними лапами в тесте суживающейся дорожки, а в тесте лесенка значимо уменьшалось общее число собранных зерен в паллетах (рис.3). При этом в обоих тестах количество контрлатеральных ошибок было больше, чем ипсилатеральных

^{‡‡} Исследования выполнены совместно с Литвиновым А.А., Мaziной Н.В.

(коэффициент асимметрии через 3 суток после ОСМА в группе контроль-ишемия составил от 20% в широкой части до 55% в узкой части «Сужающейся дорожки»).

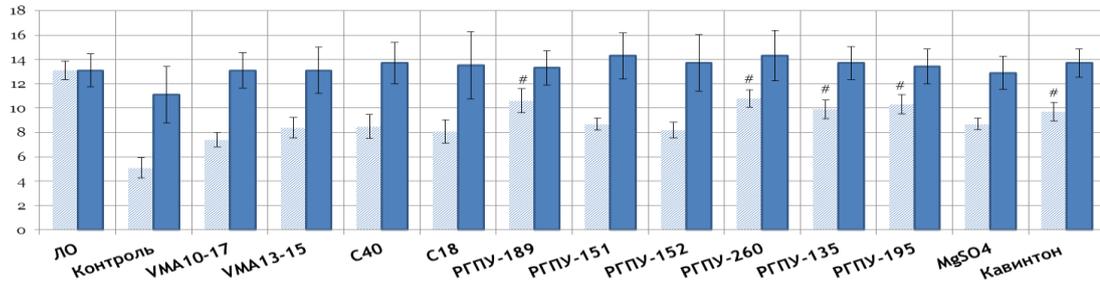


Рис. 3. Количество зерен, собранных животными в «Staircase-test» на 7 сутки после фокальной ишемии головного мозга у животных с НПГ.

Обозначения: как на рис.2.

Курсовое введение при НПГ соединений РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260 (рис.4А) и при СД – РГПУ-189, РГПУ-195 (рис.4Б) способствовало восстановлению моторных функций конечностей у животных, о чем свидетельствовал меньший коэффициент асимметрии и меньшее количество соскальзываний задних лап в данных группах по сравнению с группой контроль-ишемия.

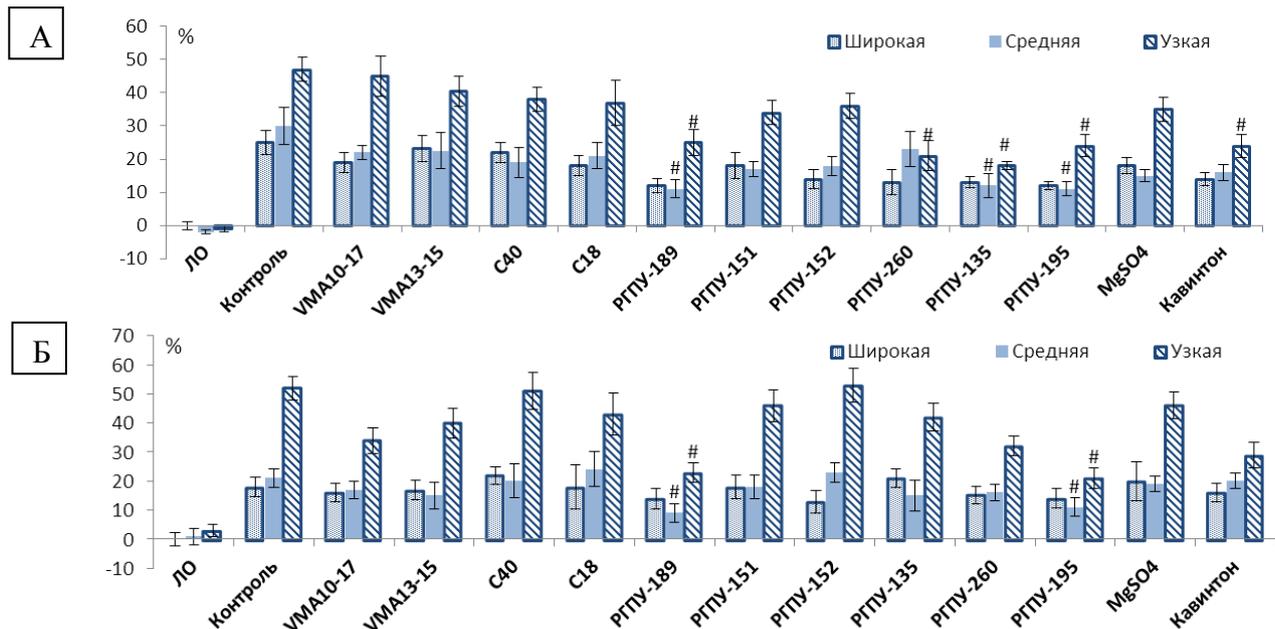


Рис. 4. Процент асимметрии у животных в тесте «Сужающейся дорожки» через 7 суток после моделирования фокальной ишемии головного мозга у крыс с НПГ (А) и СД (Б).

Обозначения: как на рис.2.

У крыс с фокальной ишемией головного мозга, воспроизводимой на фоне НПГ и СД, относительно животных без ишемического повреждения в тесте ОП отмечалась меньшая двигательная и ориентировочно-исследовательская активность (рис.5). У крыс с фокальной ишемией, получавших соединения С40, РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260, кавинтон при НПГ (рис.5А) и соединения РГПУ-189, РГПУ-260, РГПУ-195 при СД (рис.5Б) показатели локомоторной и исследовательской активности были статистически значимо выше, чем у животных контрольной группы.

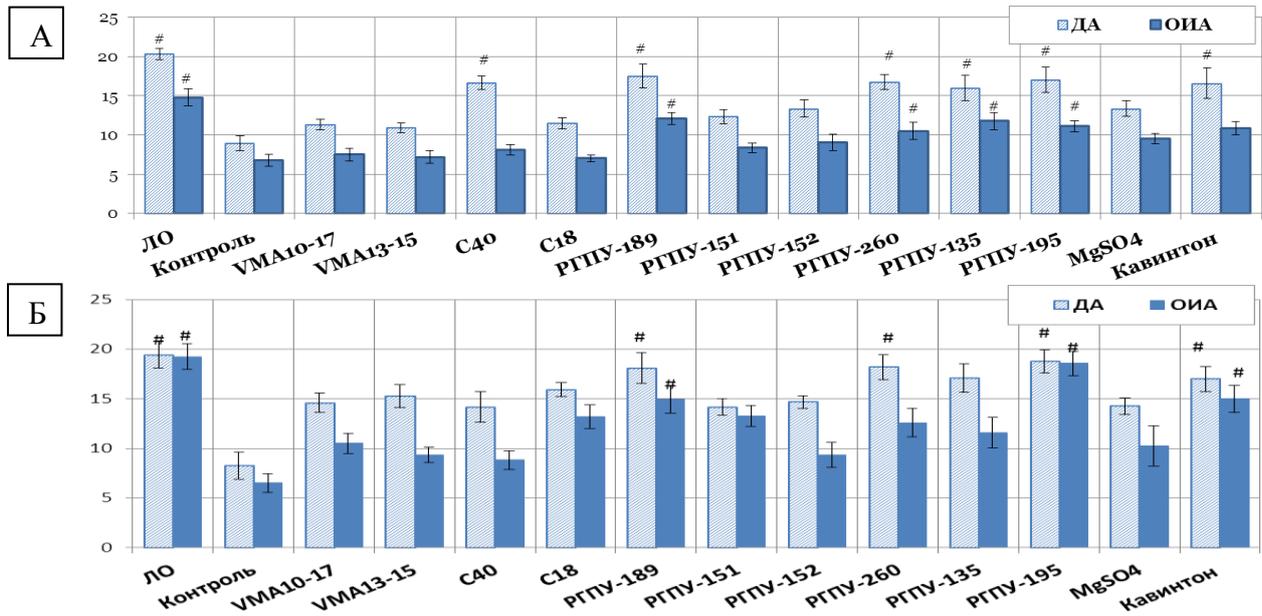


Рис. 5. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных с фокальной ишемией на фоне НПГ (А) и СД (Б).

Обозначения: ДА- двигательная активность; ОИА – ориентировочно-исследовательская активность; остальные обозначения как на рис.2.

Анализ сохранности мнестической функции животных с фокальной ишемией головного мозга, получавших соединения РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260, по результатам двух тестов (УРПИ и ТЭИ) показал, что их введение приводило к лучшему сохранению памяти после ОСМА по отношению к животным, которым вводились другие исследуемые вещества, и к группе контроля (рис.6).

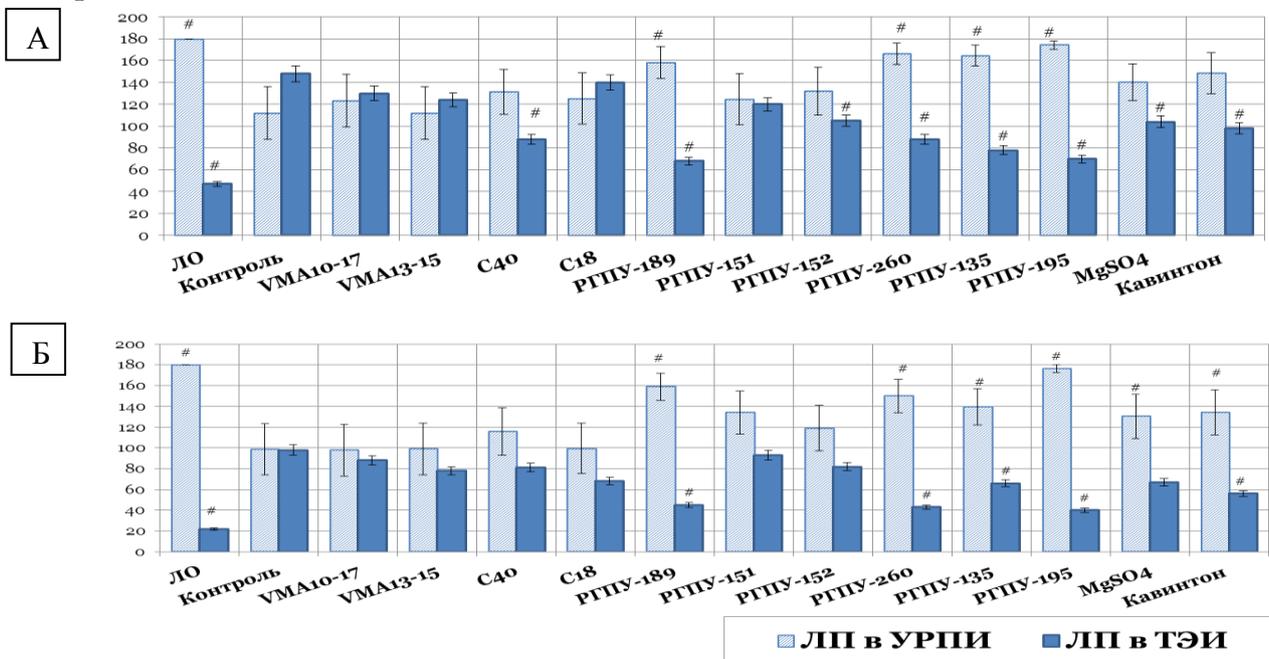


Рис. 6. Латентный период подныривания (ЛП) в тесте ТЭИ и латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ животных через 7 суток после ОСМА на фоне НПГ (А) и СД (Б).

Обозначения: как на рис.2.

Таким образом, выраженность поведенческого, когнитивного дефицита у животных с фокальной ишемией, получавших наиболее активные вещества была меньше.

Изучение уровня МК и функционального состояния эндотелиальной системы мозговых сосудов в постинфарктный период у животных, которым курсом вводили исследуемые вещества, позволило оценить один из возможных механизмов их церебропротекторного действия. Исходный МК у группы ЛО составил в среднем $4,8 \pm 0,2$ у.е., у животных контроль-ишемия – на стороне перевязки средней мозговой артерии был равен $1,2-2,2$. ($p < 0,05$; рис.7). МК у групп животных, получавших все исследуемые соединения, был выше, чем у группы контроль-ишемия, но более высокие значения МК были в группах животных, которые получали РГПУ-189, РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260. В данных группах был более выражен ответ и на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина, что свидетельствует о лучшем функциональном состоянии эндотелия.

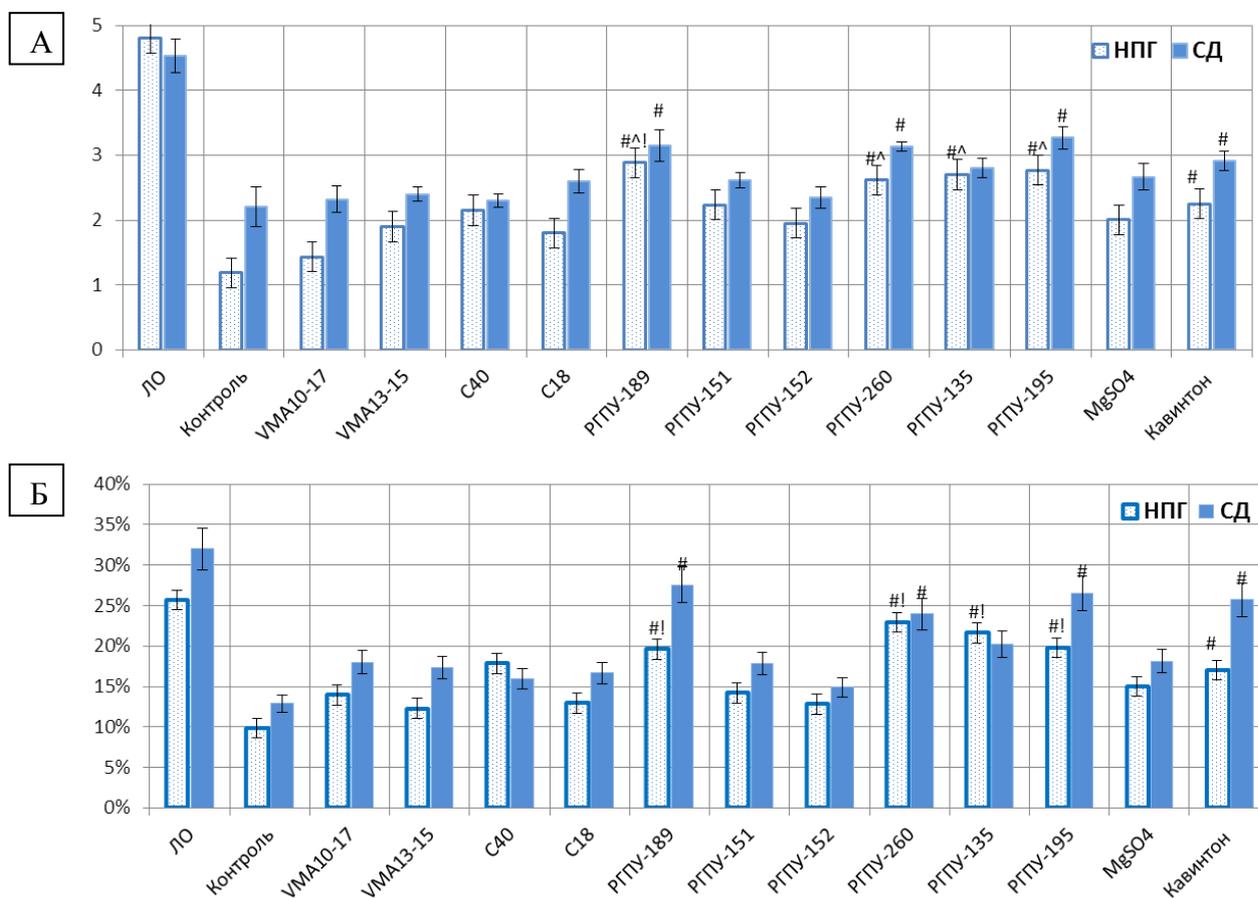


Рис. 7. Уровень МК (у.е.) (А) и процент его повышения при введении ацетилхолина (Б) у крыс с ОСМА на фоне НПГ и СД.

Обозначения: # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой животных. ! - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших магния сульфат; ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон.

В контрольной группе с ОСМА зона инфаркта составила $263,7 \pm 68,5$ мм³ (при НПГ, рис.8А) и $308 \pm 70,8$ мм³ (при СД, рис.8Б). Введение исследуемых соединений

(РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) уменьшило объем повреждения в среднем соответственно на 22,4-34,1% (при НПГ) и 19,4-29,2% (при СД).

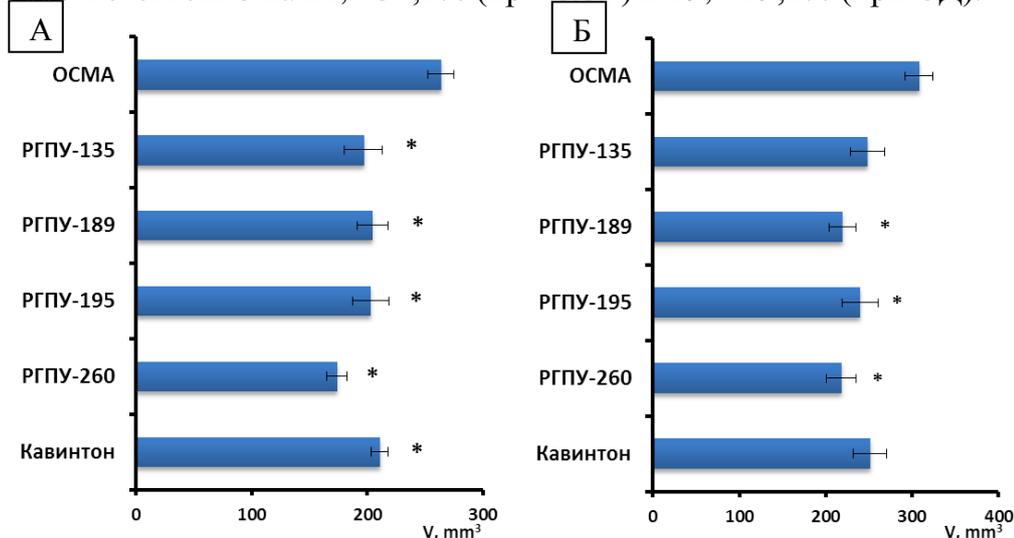


Рис. 8. Объем инфаркта мозга при окклюзии средней мозговой артерии на фоне НПГ (А) и СД (Б)

Обозначения: * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, в результате скрининга 4 химических рядов, были определены 10 веществ, обладающих церебропротекторной активностью при моделировании НМК на условно здоровых животных, однако при моделировании ишемии головного мозга на фоне НПГ более эффективными были соединения РГПУ-135, РГПУ-195, РГПУ-260, РГПУ-189, на фоне СД РГПУ-189, РГПУ-260, РГПУ-195.

Глава 5. Учитывая важную роль артериальной гипертензии и гипертонических кризов в формировании НМК и, связанной с этим энцефалопатии, была разработана модель хронической экспериментальной недостаточности кровообращения, создаваемая путем 28-дневного 9-ти кратного гравитационного воздействия в каудо-краниальном векторе на экспериментальных животных. Многократно-повторяющиеся гравитационные воздействия позволили воспроизвести у животных НМК, имеющие место при гипертонических кризах у больных артериальной гипертензией и сопровождающиеся симптомами хронической недостаточности мозгового кровообращения.

Исследуемые соединения (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) и препараты сравнения вводились в течение 14 дней по окончании 28-ми дневного воздействия гравитационных перегрузок в каудо-краниальном направлении. Было установлено, что соединения РГПУ-195 (в большей степени), РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-260 способны улучшать мозговое кровообращение при его хроническом нарушении и снижать выраженность эндотелиальной дисфункции (табл.2), тем самым уменьшая когнитивные и мнестические нарушения (табл. 3).

Таблица 2

Уровень МК и его изменения в ответ на введение ацетилхолина, нитро-L-аргинина животным с хроническим НМК

Группы животных	Фоновые значения, у.е.	Повышение МК на введение ацетилхолина, % прироста	Снижение МК на введение нитро-L-аргинина, % падения
Интакт	4,1±0,4	26,1%	-30,7%
Контроль-ишемия	3,2±0,3#	11,3%#	-14,2%#
РГПУ-135	3,9±0,4*	19,6%*	-23,4%*
РГПУ-189	3,87±0,3*	20,1%*	-25,6%*
РГПУ-195	4,04±0,3*	24,2%*	-27,9%*
РГПУ-260	3,7±0,4*	20,6%*	-22,3%*
Цитиколин	3,7±0,3*	19,8%*	-20,1%*
Глиатилин	3,91±0,4*	21,2%*	-25,1%*

Примечание: # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой интактных животных; * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой «контроль-ишемия» (животные с ХНМК).

Таблица 3

Показатели животных с хроническим НМК в тестах ТЭИ, УРПИ, ПКЛ.

Группа	ТЭИ		УРПИ		ПКЛ	
	ЛП подныривания, с	% решивших задачу	ЛП захода в тёмный отсек теста УРПИ, с	% зашедших в темный отсек	В _{ор} , с	КЗ _{ор}
Интакт	10,8±0,8*	100	180*	0	95,4±5,4 *	4,3±0,2
Контроль-ишемия	97,8±21	58	127,9±22,3	33	13,1±1,9	1,14±0,1
РГПУ-135	63,3±16,1	83	166±14	8	53,4±3,7 *	3,6±0,4 *
РГПУ-189	66,3±15,8	83	180*	0	44,86±3,9*	3,2±0,3 *
РГПУ-195	42,8±4,9*	100	180*	0	29,9±2 *	2,0±0,3
РГПУ-260	81,3±21,2	67	150,5±19,9	17	26,3±2,4	2,2±0,4
Цитиколин	75,4±22,5	67	167±13	8	27,0±1,9	2,4±0,2
Глиатилин	51,0±12,3	92	180*	0	28,6±2,3	1,9±0,3

Примечание: * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой «контроль-ишемия»; В_{ор} - время в открытых рукавах (с); КЗ_{ор} – количество заходов в открытые рукава.

Соединение РГПУ-135 также в условиях ХНМК оказывало анксиолитическое действие (табл.3), что будет, несомненно, полезным при его применении у пожилых лиц с НМК, имеющих тревожно-депрессивные наслоения.

В главе 6, учитывая многочисленные исследования о том, что даже при отсутствии других факторов риска возраст выступает в виде независимой патогенетической причины повышения заболеваемости и смертности от церебрального инсульта, представлены результаты по изучению церебро- и эндотелиопротекторных свойств наиболее активных соединений у старых животных. Установлено, что у 24-х месячных животных, которым воспроизводили НМК путем перевязки одной сонной артерии полностью и ограничения кровотока по другой сонной артерии до значения, составляющего 50 - 60% от исходного, наиболее выраженным церебропротекторным эффектом обладали два соединения РГПУ-189 и РГПУ-135, что проявлялось в повышении выживаемости животных (табл. 4) и снижении у них выраженности неврологических нарушений (рис.9).

Таблица 4.

Летальность 24 месячных животных в условиях окклюзии сонных артерий на фоне введения исследуемых соединений

Группа	Число выживших	Число погибших	Отношение шансов
Контроль	6	14	-
РГПУ-135	17	3	13,2±0,8*
РГПУ-189	15	5	7±0,7*
РГПУ-195	14	6	5,4±0,7*
РГПУ-260	14	6	5,4±0,7
Магния сульфат	12	8	3,5±0,7*
Кавинтон	14	6	5,4±0,7*
Цитиколин	16	4	9,33±0,7*

Примечание: * - достоверно по отношению к группе контроль (p<0,05).

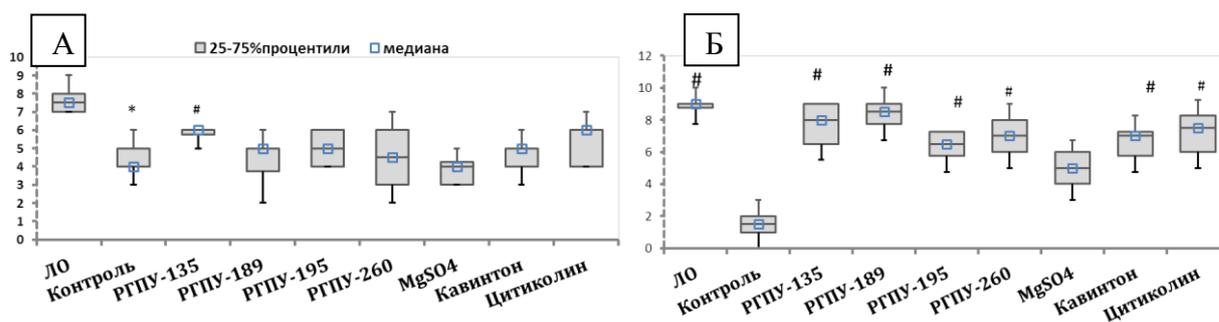


Рис. 9. Выраженность неврологического дефицита по шкале Coombs в баллах у 24-х месячных животных через 6 (А) и 72 (Б) часа после моделирования ОСА на фоне курсового введения исследуемых соединений

Обозначения: как на рис.2.

Моделирование ишемии головного мозга у старых животных приводило к снижению МК относительно показателей группы ЛО в среднем на 42%. Курсовое введение исследуемых соединений, но в большей степени РГПУ-135 и РГПУ-189 способствовало сохранению кровотока на более высоком уровне (табл.5).

Таблица 5

Изменения МК в ответ на введение ацетилхолина, нитро-L-аргинина, нитроглицерина у 24-х месячных животных окклюзии ОСА.

Группы животных	МК, у.е.	Изменения кровотока от исходного уровня (%) при введении анализаторов		
		Ацетилхолин	Нитро-L-аргинин	Нитроглицерин
ЛО	4,72±0,3	28,9±2,3	-30,4±3,3	31,5±2,5
Контроль Ишемия	2,73±0,2	11,8±1,9	-14,5±1,4	30,9±2,4
РГПУ-135	3,38±0,3*	25±1,6*	-28,8±1,8*	32,6±2,6
РГПУ-189	3,27±0,2*	21,9±2,2*	-23,8±1,4*	33,0±2,8
РГПУ-195	3,13±0,2	17,9±1,1*	-21,6±1,1*	33,0±1,7
РГПУ-260	3,1±0,4	17,3±0,9	-17,8±1,3	34,2±0,5
Магния сульфат	3,06±0,2	16,8±2,1	-21,0±2,0*	30,4±2,5
Кавинтон	3,16±0,2	23,3±1,7*	-22,4±1,8*	30,8±2,5
Цитиколин	3,31±0,2*	25,6±2,7*	-27,3±2,3*	31,3±2,6

Примечание:

ЛО (контроль-интакт)- ложнооперированные животные; Ишемия (контроль-ишемия) – группа животных с окклюзией общих сонных артерий, получавшая 0,9 % раствор NaCl; # - достоверно по отношению к группе животных с окклюзией ОСА, получавшей 0,9 % раствор NaCl (p<0,05).

При оценке ЭЗВД было отмечено, что у старых животных после окклюзии ОСА реакция на введение модуляторов синтеза оксида азота (ацетилхолина и нитро-L-аргинина) менее выражена, чем у группы ЛО (табл.5). Курсовое введение соединений РГПУ-135 и РГПУ-189 улучшало ЭЗВД, о чем свидетельствовало больший прирост МК при введении ацетилхолина и более выраженное его снижение при введении нитро-L-аргинина (табл.5).

Далее для уточнения возможных механизмов протекторного действия наиболее активных соединений (РГПУ-189 и РГПУ-135) у старых животных было выполнено исследование их церебро- и эндотелиопротекторных свойств у животных двух возрастных групп (12-ти и 24-х месяцев) в условиях хронического стрессорного воздействия.

Установлено, что комбинированное стрессорное воздействие вибрации, шума, света, иммобилизации и повышение температуры в равной степени снижало двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность у 12-ти и 24-х месячных животных. Применение РГПУ-135, РГПУ-189 и фенибута уменьшало выраженность этих изменений.

Стрессорное воздействие не приводило к развитию амнезии у животных 12-ти месяцев, тогда как у животных 24-х месяцев такие явления были отмечены. У животных, получавших соединения РГПУ-189 (в большей степени), РГПУ-135 и фенибут, латентный период захода в темный отсек был больше, а количество животных, зашедших в него, меньше (табл.6), что свидетельствует о лучшем сохранении памятного следа у данных крыс.

Таблица 6
Влияние соединений на формирование и сохранение памятного следа в УРПИ у 12-ти и 24-х месячных крыс до и после стрессирования.

Группы		До стресса				После стресса	
		Обучение		Воспроизведение 1		Воспроизведение 2	
		ЛП	КЗ	ЛП	КЗ	ЛП	КЗ
Интакт	12 мес	30,1±5,8	1±0	180	0	180	0
	24 мес	54,5±11,7	1,3±0,2	149,2±20,6	0,2±0,1	180	0
Контроль	12 мес	43,9±12,5	1±0	180	0	180	0
	24 мес	41,9±8,8	1,1±0,1	145,5±23	0,2±0,1	110,7±28,3	0,4±0,2
РГПУ-135	12 мес	32,3±10,7	1±0	180	0	180	0
	24 мес	41,9±12,2	1±0	165,6±13,7	0,1±0,1	150,4±18,8	0,2±0,2
РГПУ-189	12 мес	30,7±12,2	1±0	180	0	180	0
	24 мес	40,1±8,6	1±0	170±9,1	0,1±0,1	180	0
Фенибут	12 мес	47,4±12,4	1±0	180	0	180	0
	24 мес	57,3±21,7	1,1±0,1	152±19,1	0,2±0,1	162,4±17,6	0,1±0,1

Примечание: ЛП – латентный период первого захода в темный отсек; КЗ – количество заходов в темный отсек; «Обучение» и «воспроизведение 1» в тесте УРПИ проводились с интервалом 24 часа. «Воспроизведение 1» выполнялось за день до начала моделирования комбинированного стрессорного воздействия, «Воспроизведение 2» - через 24 часа после окончания стрессорного воздействия.

Известно, что существует прямая связь между уровнем артериального давления (АД), выраженностью когнитивных нарушений и риском сердечно-сосудистых осложнений, чем выше показатели систолического и/или

диастолического АД, тем выше риск развития инсульта (Суслина З. А., Варакин Ю. Я., 2004). Исходный уровень АД (до начала стрессорного воздействия) был сопоставимым у животных 12-ти и 24-х месячного возраста ($122,8 \pm 1,3$ мм рт. ст. и $124 \pm 2,2$ мм рт. ст., соответственно). Хроническое стрессорное воздействие приводило к повышению АД у экспериментальных животных (в большей степени у животных 24-х месячного возраста до $149,5 \pm 6,2$ мм рт. ст., что на 23,6% выше их исходного уровня, тогда как у крыс 12-мес возраста АД поднялось только до $139,5$ мм рт.ст., т.е. на 13,2%). На фоне применения исследуемых соединений РГПУ-135 и РГПУ-189, а также препарата сравнения фенибута наблюдалось менее выраженное повышение АД у стрессированных животных, что может свидетельствовать как об их антистрессорном, так и о возможном влиянии на механизмы регуляции АД и сосудистого тонуса.

При исследовании функционального состояния эндотелиальной системы у животных различных возрастных групп, подвергшихся хроническому стрессорному воздействию установлено, что у интактных 12-месячных крыс исходный МК был выше на 9,7% ($p > 0,05$), чем у старых (24-х месяцев), и на 27,4% ($p < 0,05$) выше, чем у стрессированных животных того же возраста (рис.10А).

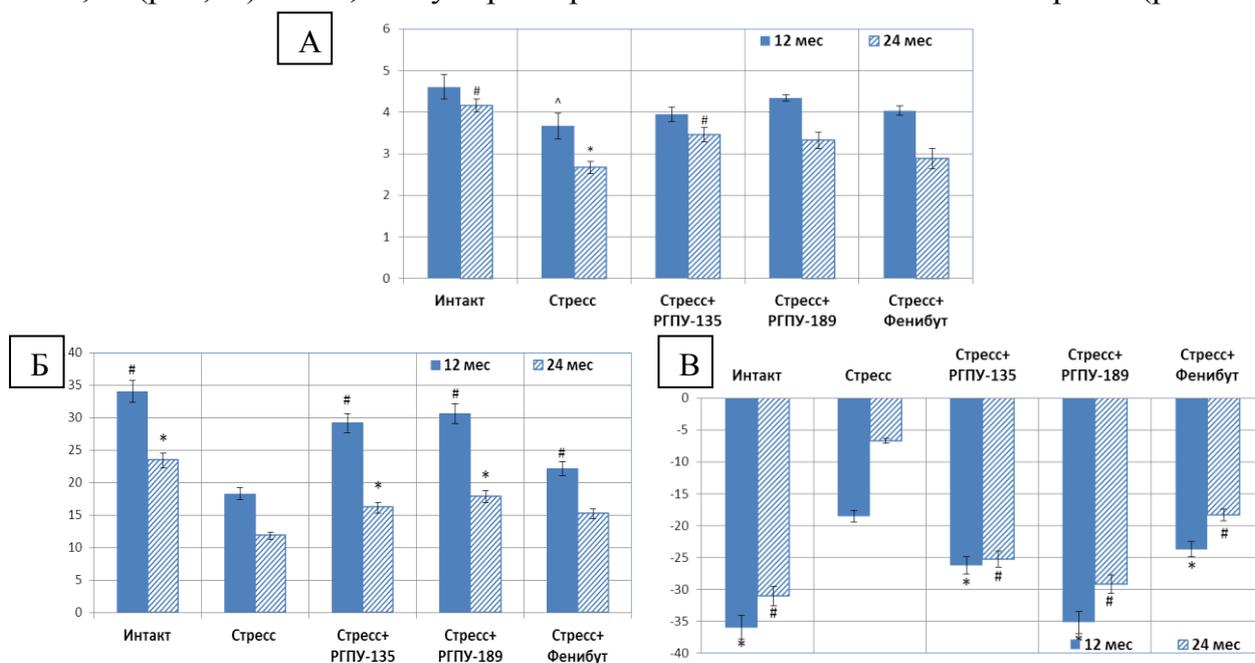


Рис. 10. Уровень МК (А) и его изменение (%) при введении ацетилхолина (Б) и нитро-L-аргинина (В) у животных двух возрастных групп (12-ти и 24-х мес).

Обозначения: ^- достоверно по отношению к группе интактных 12 мес крыс ($p < 0,05$); *- достоверно по отношению к группе стрессированных 12 мес крыс ($p < 0,05$); #- достоверно по отношению к группе стрессированных 24 мес крыс ($p < 0,05$).

При оценке вазодилатирующей функции эндотелия отмечено, что у крыс старшей возрастной группы на фоне хронического стрессорного воздействия отмечалась менее выраженная сосудистая реакция на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина, как по сравнению с интактными животными, так и стрессированными животными средней возрастной группы (рис.10). Оба исследуемых вещества (РГПУ-135 и РГПУ-189) оказывали эндотелиопротекторное

действие, улучшая мозговое кровообращение и функциональное состояние эндотелиальной системы (рис.10).

Результатом воздействия неблагоприятных и повреждающих факторов на эндотелий является воспалительная реакция со стороны сосудистой стенки. В определенных условиях защитная реакция организма в ответ на различные виды повреждения становится избыточной и может быть причиной развития патологических состояний. Нарушение функции эндотелиальных клеток или их деструкция приводят к агрегации тромбоцитов, лейкоцитов и формированию внутрисосудистых тромбов. Кроме того, после активации воспалительными медиаторами сами эндотелиальные клетки являются продуцентами ряда биологически активных веществ (например, VCAM-1), которые накапливаются и вызывают дополнительное высвобождение цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-8, ИЛ-6, ФНО- α) (Иванова С.В., 2014; Dantzer R., 2008).

Исследование цитокинового профиля сыворотки животных позволило установить, что стрессирование 24-х мес крыс приводит к повышению уровня циркулирующих адгезивных молекул суперсемейства иммуноглобулинов VCAM-1, которые, как известно (Черешнев В.А., 2002), вовлечены в регуляцию адгезии лейкоцитов к эндотелию и их миграции за пределы сосудистого русла в очаг воспаления. Следует отметить, что повышение уровня этих молекул происходило на фоне увеличения концентрации СРБ и уменьшения – ИЛ-6 у стрессированных животных, что свидетельствует о снижении их провоспалительного потенциала (табл.7).

Таблица 7.

Уровни цитокинов, адгезивных молекул, СРБ в сыворотке крови крыс, подвергшихся стрессорному воздействию.

Группы	VCAM-1, нг/мл		ИЛ-6, пг/мл		СРБ	
	12 мес	24 мес	12 мес	24 мес	12 мес	24 мес
Интакт	1,26 \pm 0,21	2,58 \pm 0,6	3,01 \pm 0,23	4,35 \pm 0,32	156,8 \pm 37,7	115 \pm 22
Стресс	2,07 \pm 0,31*	3,05 \pm 0,1*	2,16 \pm 0,12*	2,39 \pm 0,53*	228,6 \pm 67*	445 \pm 40,3*
Стресс+РГПУ-135	2,1 \pm 0,09	2,13 \pm 0,3#	2,71 \pm 0,4#	3,44 \pm 0,52#	194 \pm 90	216 \pm 53#
Стресс+РГПУ-189	1,97 \pm 0,5	2,33 \pm 0,25	2,57 \pm 0,3	3,32 \pm 0,36	160 \pm 54#	136,4 \pm 49,8#
Стресс+фенибут	1,95 \pm 0,48	2,67 \pm 0,38	2,79 \pm 0,31#	2,89 \pm 0,37	173 \pm 18	235 \pm 63,4

Примечание:

*- значимые различия ($p < 0,05$) от интактных животных; #- значимые различия ($p < 0,05$) от стрессированных животных.

Оба исследуемых соединения (РГПУ-189 и РГПУ-135) влияли на уровни цитокинов, адгезивных молекул и СРБ у стрессированных животных 12-ти и 24-х месячного возраста, снижая содержание VCAM-1, СРБ и повышая уровень ИЛ-6 по сравнению с контрольными группами стрессированных животных. Однако,

соединения РГПУ-135 более значимо снижало уровень VCAM, а соединение РГПУ-189 – ИЛ-6 и СРБ (табл.7).

Иммуногистохимические исследования препаратов головного мозга крыс двух возрастных групп свидетельствуют о повышении экспрессии индуцибельной изоформы NOS и снижение экспрессии эндотелиальной NO-синтазы как в процессе физиологического старения (интактные животные), так и на фоне стрессового воздействия. Исследуемые соединения РГПУ-135 и, в несколько большей степени, РГПУ-189 способствовали увеличению экспрессии eNOS-позитивного материала и уменьшению iNOS-позитивного материала практически до значений интактных животных (рис.11), что может лежать в основе их эндотелиопротекторного действия.

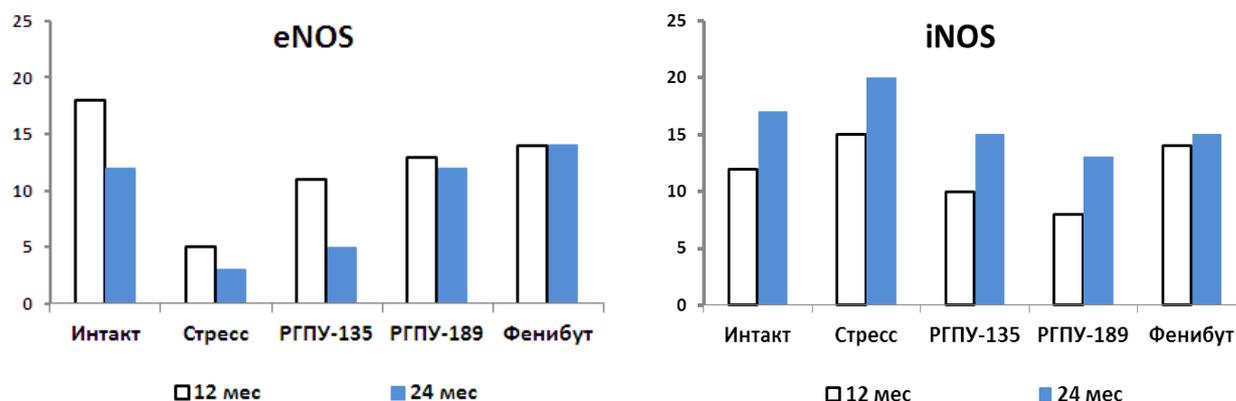


Рис. 11. Динамика изменения iNOS- и eNOS-иммунопозитивных нейронов головном мозге у стареющих крыс в условиях стресса (суммарный балл иммунореактивного материала).

Таким образом, можно предполагать, что соединения РГПУ-135 и РГПУ-189 будут эффективны у лиц пожилого возраста в качестве средств профилактики и лечения НМК.

Глава 7^{§§} посвящена изучению влияния иммунного статуса животных на церебропротективные эффекты РГПУ-135 и препаратов сравнения при ишемии головного мозга. В настоящее время в клинической практике все больше внимание уделяется нейроиммунным нарушениям, которые имеют место быть при НМК. В связи с чем на примере соединения РГПУ135, который по результатам ранее проведенных исследований способен оказывать иммуномодулирующее действие (Самотруева М.А., 2012), был выполнен блок экспериментов для оценки его эффективности при ишемическом поражении головного мозга в условиях интактного и измененного состояния иммунной системы животных. Установлено, что вызванная 13-ти дневным пероральным введением циклоспорина иммуносупрессия усугубляет течение ишемии головного мозга, что проявляется снижением выживаемости животных после двусторонней ОСА (табл.8), а у выживших животных отмечались более выраженные неврологические нарушения,

^{§§} Исследования выполнены совместно с Филиной И.С.

а именно снижение мышечной силы, нарушением координации движений, угнетение двигательной и ориентировочно-исследовательской активностей, когнитивной функции.

Таблица 8

Выживаемость животных после поэтапной необратимой окклюзии ОСА.

Состояние иммунной системы	Группа животных	N	Время после поэтапной окклюзии общих сонных артерий				
			12 часов	24 часа	48 часов	72 часа	7 суток
Интактная иммунная система	ЛО	15	100%	100%	100%	100%	100%
	Ишемия	20	80%	75%	70%	65%#	45%##
	РГПУ-135	15	100%	100%	93,3%	93,3%	80%
	Фенибут	15	100%	93,3%	93,3%	86,7%	66,7%
	Церебролизин	15	100%	93,3%	93,3%	93,3%	80%
Подавленная иммунная система	ЛО	15	100%	100%	100%	100%	93,3%
	Ишемия	20	80%	70%	60%#	50%#	25%#
	РГПУ-135	15	100%	93,3%	93,3%	86,7%	80%
	Фенибут	15	93,3%	86,7%	80%	80%	60%
	Церебролизин	15	100%	100%	100%	93,3%	80%
Активированная иммунная система	ЛО	15	100%	100%	100%	100%	100%
	Ишемия	20	85%	80%	75%	75%*	60%#*
	РГПУ-135	15	100%	100%	86,7%	96,7%	80%
	Фенибут	15	100%	93,3%	93,3%	93,3%	80%
	Церебролизин	15	100%	86,7%	80%	73,4%	60%

Примечание: N – общее количество животных в группе ; ЛО – ложнооперированная группа животных; # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных ($p < 0,05$); ## - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных ($p < 0,01$); *- различия достоверны по сравнению с группой животных ишемия с подавленной иммунной системой ($p < 0,05$).

Во всех группах животных с церебральной ишемией, получавших РГПУ-135 и фенибут, показатель смертности (табл.8) и неврологический дефицит (рис.12) были меньше, чем у животных контрольной группы.

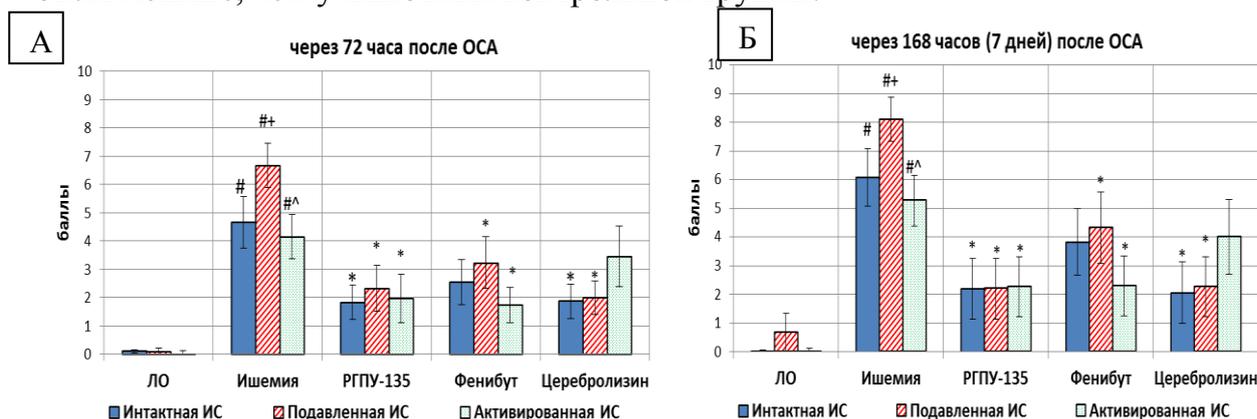


Рис. 12. Неврологический дефицит по шкале McGraw у животных через 3 (А) и 7 (Б) дней после поэтапной окклюзии общих сонных артерий.

Обозначения: ЛО – ложнооперированная группа животных; # - по сравнению с ЛО группой животных; * - по сравнению с группой ишемия; + - по сравнению с аналогичной группой животных с интактной иммунной системой; ^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой (различия достоверны при $p < 0,05$).

При этом у крыс, получавших РГПУ-135, гибель была значительно ниже, чем в контрольной группе при всех состояниях иммунной системы, а

неврологический дефицит через 7 дней после ОСА был наименьшим среди всех исследуемых групп (рис.12Б). Церебролизин, оказывал более выраженный протективный эффект при подавленной и интактной иммунной системе, а фенибут при активированной и интактной.

В группах ЛО при различных состояниях иммунной системы значимых отличий как в тесте Rota-Rod, так и в ОП не отмечалось (табл. 9).

Таблица 9
Показатели поведения животных в тестах «Открытое поле» и Rota-Rod через 7 суток после окклюзии общих сонных артерий.

Состояние иммунной системы	Группа животных	ОП		Rota-Rod	
		ДА	ОИА	ЛП падения	Время удержания
Интактная иммунная система	ЛО	29,1±1,7	20,3±1,4	38,1±3	117,4±5,9
	Ишемия	11,1±1,3 [#]	6,3±0,8 [#]	9,3±0,9 [#]	29,9±1,8 [#]
	РГПУ-135	19,5±1,8*	14,1±1,7*	28,1±2,1*	82,3±7*
	Фенибут	14,2±1,3	7,1±1,1	16,6±1,5*	50,5±4,2*
	Церебролизин	19,5±2*	13,4±1,5*	26,7±2*	79,2±5*
Подавленная иммунная система	ЛО	25,2±1,2 ⁺	16,1±1,6 ⁺	32,7±2,3	101,2±8,5
	Ишемия	6,3±1,2 ^{#+}	3,6±1 ^{#+}	7,5±0,9 [#]	24,3±1,4 ^{#+}
	РГПУ-135	16,5±1,8*	12,9±1,5*	25,8±1,2*	73,8±9,2*
	Фенибут	10,4±0,7* ⁺	6±0,6*	9,7±0,9 ⁺	36,3±6,1
	Церебролизин	17,9±1,2*	12,7±1,4*	24,6±2,4*	70,1±5,9*
Активированная иммунная система	ЛО	27,3±2,0	18,5±1,4	35,1±2,7	119,9±7,4
	Ишемия	15±1,5 ^{#+^}	4,5±0,8 [#]	11,3±1,2 ^{#^}	44,1±4,7 ^{+^#}
	РГПУ-135	18,2±1,9	14,5±1,5*	27,3±1,7*	86,2±8,4*
	Фенибут	16,3±1,2 [^]	11,4±1,3 ^{^+}	23,7±1,8* ^{+^}	74±3,2* ^{+^}
	Церебролизин	13,7±1,7 ^{+^}	7,6±1,1* ^{+^}	18,2±1,3* ^{+^}	56,1±3,5* ^{+^}

Примечание:

ЛО – ложнооперированная группа животных; ЛП – латентный период первого падения; Время удержания – суммарное время удержания на вращающемся стержне; # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; + - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с интактной иммунной системой; ^ - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой.

После окклюзии ОСА у животных снижалась двигательная, ориентировочно-исследовательская активность, сила и координация. При этом изменения в иммунном статусе влияли на течение ишемии, усугубляя ее последствия при подавлении иммунитета. Так у животных контрольной группы с подавленным иммунитетом в тесте ОП наблюдалась меньшая двигательная и исследовательская активность, а в тесте Rota-rod меньший латентный период падения среди всех групп с ишемией (табл.9).

У животных с экспериментальным НМК, получавших соединение РГПУ-135, показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте ОП и координация в тесте Rota-Rod были значительно выше, чем у животных контрольных групп. Препараты сравнения проявляли церебропротективные свойства, однако защитное действие фенибута было более выражено у животных, которым моделировали ишемию на фоне активации иммунной системы, тогда как

церебролизин был эффективен при подавленном и неизменном иммунитете (табл.9).

У животных после моделирования НМК отмечалось значительное снижение уровня кровотока (в среднем на 39,5-44,3%) в проекции средней мозговой артерии (рис.13А) на фоне повышения степени гидратации мозговой ткани (рис.13Б).

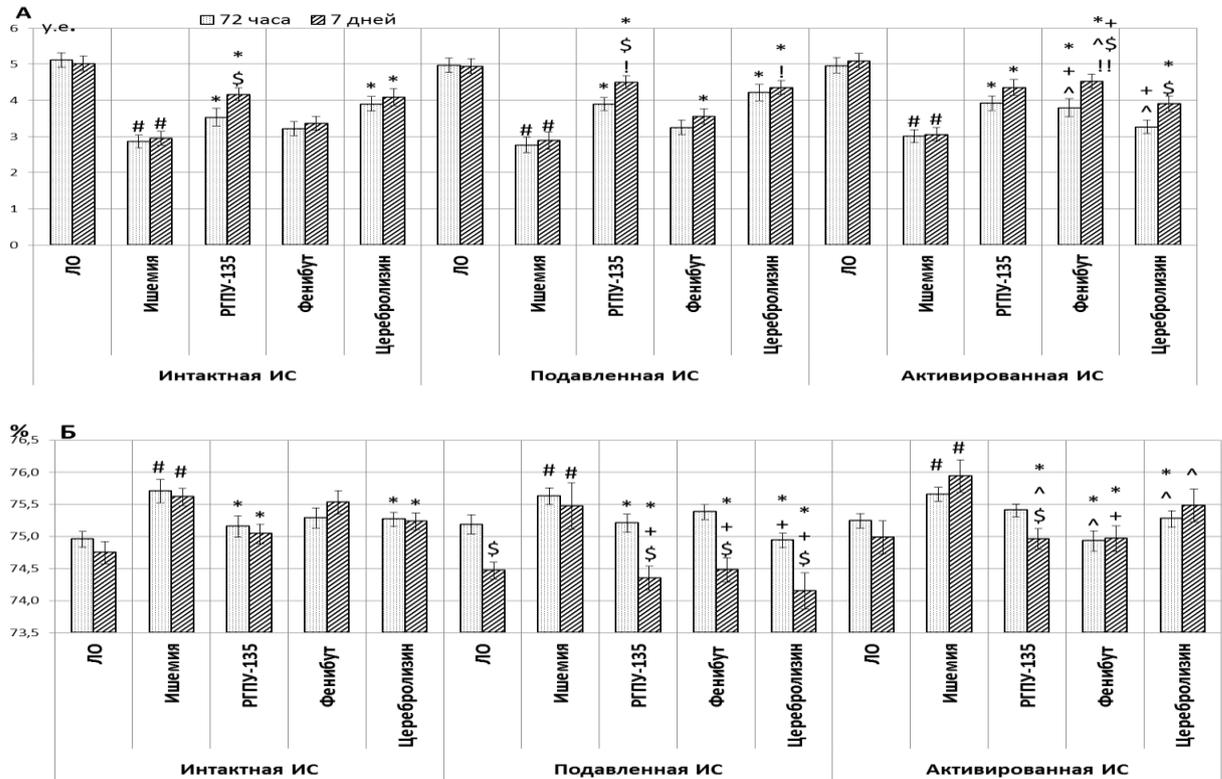


Рис. 13. Уровень локального мозгового кровотока (А) и процент гидратации мозговой ткани (Б) после позтанной необратимой окклюзии общих сонных артерий (ОСА) у животных с интактной, подавленной, активированной иммунной системой.

Обозначения: # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; * - различия достоверны по сравнению с группой ишемией; + - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с интактной иммунной системой; ^ - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой; \$ - различия достоверны между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных; ! - различия достоверны на 7 день лечения по сравнению с группой животных, получавшей фенибут.

Влияние исследуемых соединений способствовало сохранению уровня мозгового кровообращения на более высоком уровне и снижению выраженности отека мозговой ткани. В группе животных с интактной, подавленной и активированной иммунной системой, получавших РГПУ-135, уровень мозгового кровотока был выше (рис.13А), а отек головного мозга меньше (рис.13Б), чем у соответствующих животных контрольной группы. При этом сравнивая показатели животных, которым вводилось данное соединение 3 и 7 дней, отмечено достоверное нарастание протективного эффекта РГПУ-135 с течением времени.

Препарат сравнения фенибут оказывал наиболее выраженное церебропротекторное действие на животных с НМК на фоне активированной иммунной системы, а церебролизин – при подавлении иммунитета.

Для дополнительной верификации степени повреждения головного мозга при его ишемии на фоне различного состояния иммунитета определяли уровень нейронспецифической енолазы – NSE и основного белка миелина – MBP в сыворотке крови крыс после окклюзии ОСА (табл.10).

Таблица 10
Содержание NSE и MBP в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной окклюзии ОСА у животных с интактной, подавленной, активированной иммунной системой.

Состояние иммунной системы	Группа животных	NSE, нг/мл		MBP, нг/мл	
		3 дня	7 дней	3 дня	7 дней
Интактная иммунная система	ЛО	1,19±0,25	0,92±0,16	1,5±0,28	0,4±0,12\$
	Ишемия	1,63±0,28	2,88±0,38\$#	1,8±0,31	1,9±0,3#
	РГПУ-135	1,66±0,57	1,19±0,27*	1,7±0,31	0,4±0,02*\$
	Фенибут	1,75±0,3	1,72±0,21*	1,7±0,40	0,8±0,2*\$
	Церебролизин	1,88±0,71	1,64±0,38*	2,0±0,5	0,6±0,17*\$
Подавленная иммунная система	ЛО	2,2±0,41+	1,09±0,28\$	1,5±0,45	0,4±0,1\$
	Ишемия	2,93±0,5+	3,44±0,4#	2,1±0,32	2,4±0,32#
	РГПУ-135	1,92±0,34	1,47±0,22*!	1,2±0,19*	0,6±0,08*\$
	Фенибут	3,61±0,72+	2,16±0,24*	3,0±0,36+	1,1±0,2*\$
	Церебролизин	2,35±0,32	1,88±0,17*	2,4±0,16	0,6±0,15*\$
Активированная иммунная система	ЛО	2,55±0,35+	1,34±0,2\$	2,3±0,33	0,9±0,2+^\$
	Ишемия	4,17±0,61+#	2,41±0,29#^\$	2,7±0,38	1,4±0,15#^\$
	РГПУ-135	2,06±0,69*	1,74±0,12*	1,2±0,27*	1,1±0,19+^
	Фенибут	3,29±0,48+	1,38±0,24*^\$	1,9±0,24^	0,9±0,2*\$
	Церебролизин	6,45±1,3+^	2,53±0,33\$	3,0±0,48	1,3±0,19+^\$

Примечание: ЛО – ложнооперированная группа животных, # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; * - различия достоверны по сравнению с соответствующей группой с НМК, получавший физиологический раствор; ^ - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой; \$ - различия достоверны между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных;! - различия достоверны на 7 день лечения по сравнению с группой, получавшей фенибут.

Через 7 дней после моделирования ишемии головного мозга у животных группы контроль-ишемия при интактном и подавленном иммунитете наблюдался высокий уровень NSE. Применение РГПУ-135 способствовало снижению уровня NSE при всех состояниях иммунной системы. Введение церебролизина приводило к снижению NSE только при неизменном и подавленном иммунитете, фенибута – при неизменном и стимулированном иммунитете.

Максимально высокий уровень MBP наблюдался на 7 день после ишемии на фоне иммуносупрессии, при этом его концентрация была достоверно выше, чем в условиях иммуностимуляции (табл.10). Применение РГПУ-135 и фенибута снижало содержание MBP после 7-ми дневного применения при всех состояниях ИС, а церебролизина – при неизменном и подавленном иммунитете.

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), который в основном синтезируется нейронами, присутствует в больших количествах в структурах головного мозга, где он играет решающую роль в его пластичности (Pikula A., 2013). Через 3 дня после моделирования НМК происходило повышение

сывороточного уровня BDNF у контрольных животных с интактной и активированной иммунной системой по отношению к ЛО крысам (табл.11).

Таблица 11

Содержание нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в сыворотке крови через 3 и 7 дней после моделирования НМК ишемического генеза у животных с интактной, подавленной, активированной иммунной системой.

Состояние иммунной системы	Группа животных	BDNF, пк/мл	
		3 дня	7 дней
Интактная иммунная система	ЛО	615,3±165\$	102,3±31
	Ишемия	1254,7±135#	511,2±106#
	РГПУ-135	1124,8±156	282,7±84\$*
	Фенибут	970,8±156	313,2±64\$*
	Церебролизин	853,4±145*	234±32\$*
Подавленная иммунная система	ЛО	826,9±166	248,5±38\$+
	Ишемия	1078,6±156	943,2±41+#
	РГПУ-135	964,8±201	523,4±45*+\$
	Фенибут	913,7±99	544,2±79*+\$
	Церебролизин	945,9±119	374,2±66*\$
Активированная иммунная система	ЛО	556,2±167^	219±19+\$
	Ишемия	1106,8±129#	597,4±97#^\$
	РГПУ-135	505,2±107*+^	386,7±66*
	Фенибут	907,8±90	390,3±68*+\$
	Церебролизин	1082,4±238	403,7±28+\$

Примечание: ЛО – ложнооперированная группа животных, # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; * - различия достоверны по сравнению с соответствующей группой с НМК, получавший физиологический раствор; ^ - различия достоверны по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой; \$ - различия достоверны между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных; ! - различия достоверны на 7 день лечения по сравнению с группой, получавшей фенибут.

На 7-е сутки после воспроизведения ишемии головного мозга было отмечено резкое снижение данного фактора в крови у животных всех исследуемых групп, однако при сравнении показателей ЛО крыс с ишемизированными животными у последних уровень BDNF был выше в среднем в 2,7-5 раза.

Исследуемое соединение РГПУ-135 у животных с активированным иммунитетом оказывало протективное действие уже через 3 дня, снижая концентрацию BDNF. Через 7 дней наблюдения у животных, получавших РГПУ-135, данный показатель снижался у всех животных (с интактным, активированным, подавленным иммунитетом) (табл.11). Препарат сравнения фенибут более значимо снижал концентрацию BDNF у животных с активированным и интактным иммунитетом, а церебролизин у животных с подавленным и интактным иммунитетом.

Таким образом, полученные данные общей выживаемости животных, суммарного балла неврологического дефицита, уровня МК, степени отека ткани головного мозга, концентрации NSE, MBP в системном кровотоке, показателей поведения животных, их координации движений и величины мышечной силы позволяют сделать вывод, что терапия ишемии головного мозга РГПУ-135 дала

одинаково положительный результат при всех состояниях иммунной системы, фенибутом – при активированном, а церебролизином – при интактном и подавленном иммунитете.

Глава 8. Представлены данные изучения механизмов церебропротекторного действия соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260.

Учитывая, что немаловажную роль в патогене НМК играют повышение агрегации форменных элементов крови, нарушение свертывающей системы, была изучена антитромботическая функция эндотелия и влияние исследуемых веществ-лидеров на коагуляционный (ТВ, ПВ, АЧТВ, уровень фибриногена и фактора Виллебранда) и сосудисто-тромбоцитарный гемостаз (модель артериального тромбоза, АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов) животных, перенесших фокальную ишемию на фоне НПГ и СД.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все вещества обладают способностью повышать антитромбогенный и антикоагуляционный потенциал эндотелия, снижая агрегационную активность тромбоцитов (рис.14), увеличивая время образования тромба, а также снижая уровень фактора Виллебранда (рис.15) и содержание фибриногена.

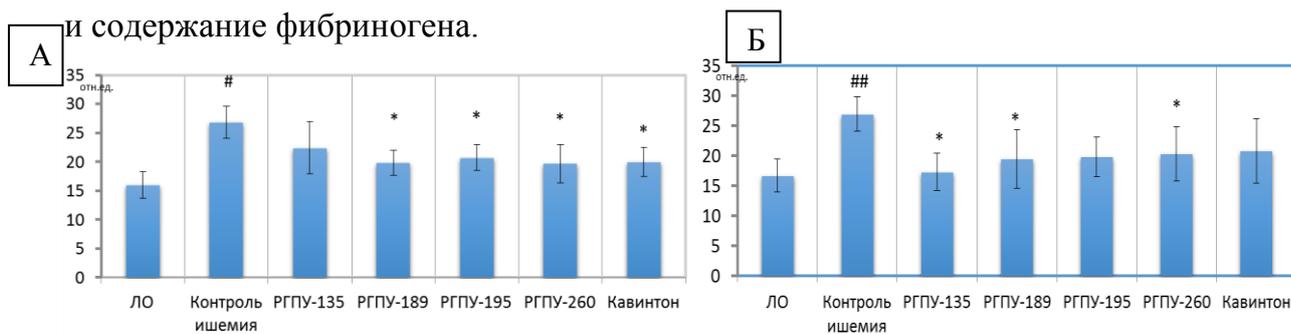


Рис. 14. Влияние исследуемых соединений на степень агрегации тромбоцитов у животных, перенесших ОСМА на фоне СД(А), НПГ(Б).

Обозначения: # - различия достоверны по сравнению с ЛО группой животных; * - различия достоверны по сравнению группой контроля-ишемия, получавший физиологический раствор.

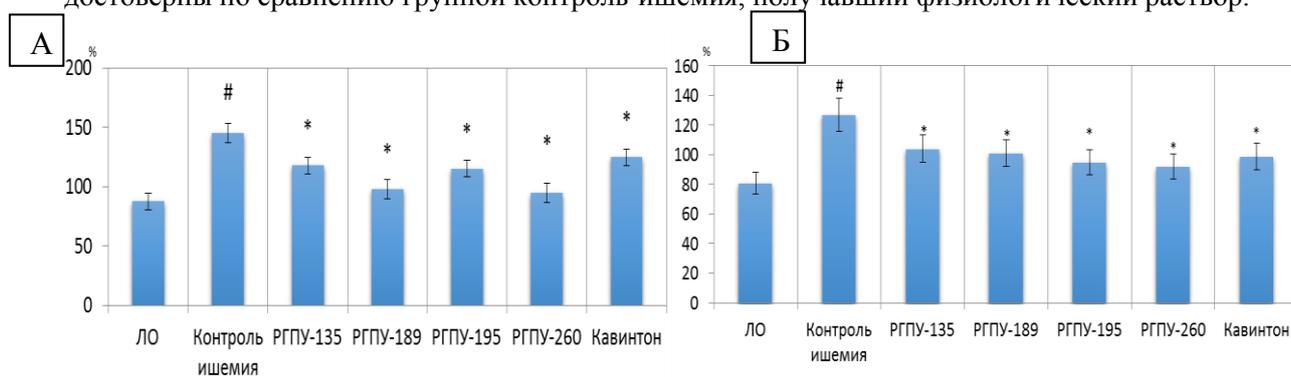


Рис. 15. Влияние исследуемых соединений на концентрацию Фактор фон Виллебранда у животных, перенесших ОСМА на фоне СД(А), НПГ(Б).

Обозначения: как на рис.14.

Далее проведено изучение влияния соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 на противовоспалительную функцию (по содержанию СРБ) эндотелия и его целостность (по количеству десквамированных эндотелиоцитов). Под влиянием исследуемых соединений было выявлено достоверное снижение

признаков воспаления (рис.16) и количества десквамированных (или слущенных) эндотелиоцитов (рис.17).

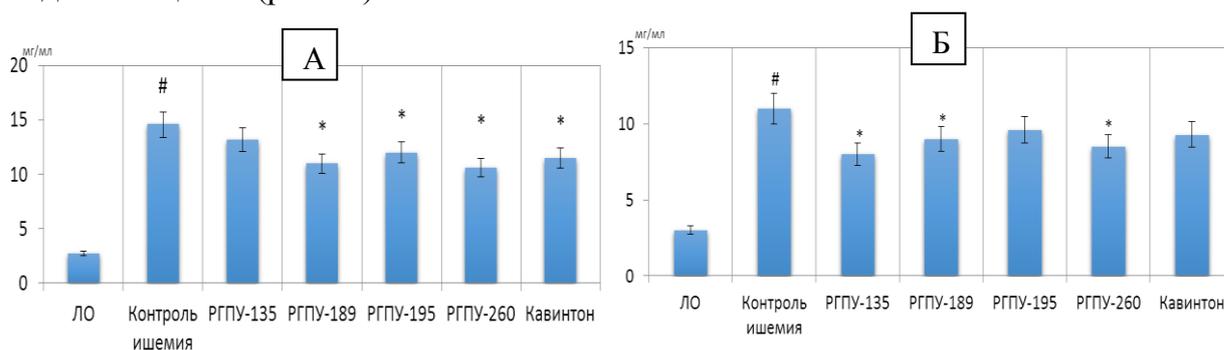


Рис. 16. Влияние исследуемых соединений на уровень СРБ у животных, перенесших ОСМА на фоне СД (А), НПГ(Б).

Обозначения: как на рис.14.

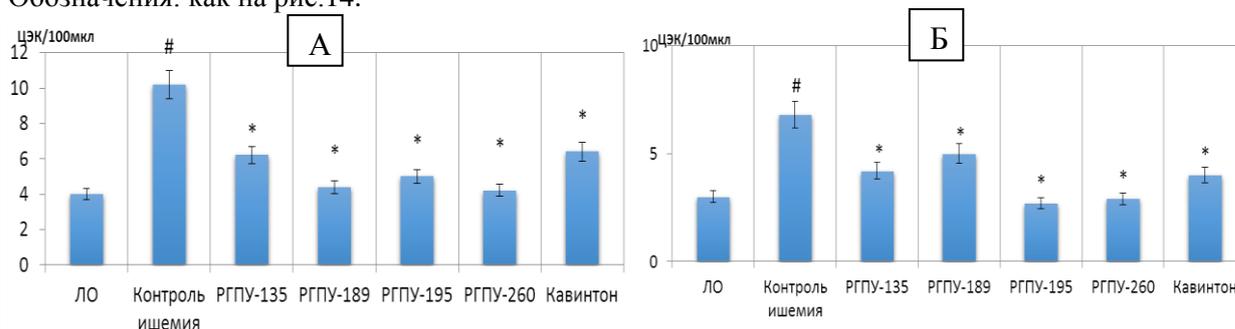


Рис. 17. Влияние исследуемых соединений на количество циркулирующих эндотелиоцитов у животных с ОСМА на фоне экспериментального СД (А) и НПГ (Б).

Обозначения: как на рис.14.

Дополнительно *in vitro* было изучено влияние соединения РГПУ-260 на продукцию NO эндотелиальными клетками и eNOS. Установлено, что исследуемое вещество повышает продукцию NO, при этом по стимулирующему действию превосходит ацетилхолин (табл.12).

Таблица 12

Влияние РГПУ-260 в концентрации 60 мкМ на продукцию NO и содержание eNOS(pS1177) в эндотелиальных клетках

Исследуемый параметр	Без стимуляции	Ацетилхолин	РГПУ-260
Продукция NO эндотелиальными клетками (Δ NO, мкМ/млн*час)	-	1,63±0,7	2,30±0,42
Содержание eNOS(pS1177) в эндотелиальных клетках (площадь пика 140кДа, у.е.)	0,138±0,043	0,536±0,156	0,697±0,171

Учитывая роль свободно-радикального окисления в развитии нейродегенеративных процессов при ишемии головного мозга, было целесообразным изучить влияние исследуемых соединений на процессы ПОЛ и состояние АОС при фокальной ишемии, моделируемой на фоне коморбидных состояний. Установлено, что курсовое введение исследуемых соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 защищает ишемизированную ткань мозга от перекисного окисления липидов, снижая содержание ТБК-активных продуктов (рис.18А, Б) и повышая активность СОД (рис.18 В, Г), увеличивает потребление глюкозы мозгом.

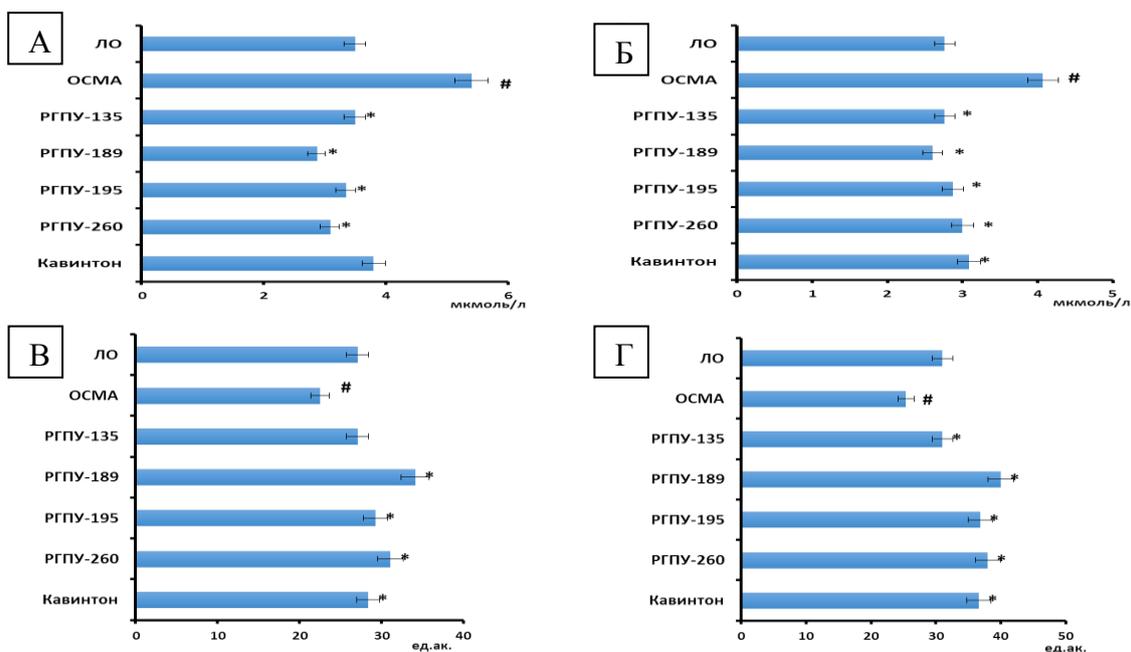


Рис. 18. Влияние соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 и кавинтона на концентрацию ТБК-активных продуктов (А, Б) и активность СОД (В, Г) у животных с экспериментальным СД (А, В) и НПГ (Б, Г) после ОСМА.

Обозначения: как на рис.14.

В Обсуждении приводится обобщение результатов, полученных в ходе исследования, их интерпретация с учетом литературных данных. Делается заключение о том, что целенаправленный поиск веществ с церебро- и эндотелиопротекторным действием среди 4х химических рядов соединений (производных ГАМК, глутаминовой кислоты, амидов гидроксibenзойных кислот, хиназолинов) позволил выделить соединения-лидеры перспективные для дальнейшей доклинической разработки, как потенциальных лекарственных средств для терапии НМК. Ими стали среди производных ГАМК – РГПУ-151, РГПУ-152, РГПУ-189 (композиции фенибута с органическими биологически активными кислотами), РГПУ-260 (композиция мефебута с L-аригинином), ГАМК – РГПУ-195 (пиридиловое производное ГАМК), среди производных глутаминовой кислоты – РГПУ-135 (фенильное производное глутаминовой кислоты), производных хиназолина – VMA10-17, VMA13-15; среди производных амидов бензойных кислот – С18, С40. Данные соединения оказывали сопоставимое по выраженности церебро- и эндотелиопротекторное действие при ишемии мозга, моделируемой на животных без отягощенного преморбидного фона, повышая выживаемость крыс, уменьшая выраженность неврологических нарушений (поведенческого, когнитивного и мнестического дефицита), способствуя сохранению МК на более высоком уровне, улучшая функциональное состояние эндотелия. При этом оказываемое ими действие было сопоставимо с таковым у препаратов сравнения цитиколина и кавинтона, превосходя действие магния сульфата.

При моделировании фокальной ишемии на животных с отягощенным преморбидным фоном церебро- и эндотелиопротекторная активность соединений

РГПУ-151, РГПУ-152, VMA10-17, VMA13-15, C18, C40 оказалась существенно ниже, чем производных ГАМК – РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260, и производного глутаминовой кислоты – РГПУ-135. При этом в условиях коморбидных состояний соединение РГПУ-189 было более эффективно при НПГ, СД, а также у старых (24-х месячных) крыс, РГПУ-135 – при НПГ, активированной, подавленной, интактной иммунной системе и у старых животных, РГПУ-195 – при хронических НМК, а соединение РГПУ-260 при СД, НПГ, хронических НМК.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости пересмотра методологии поиска средств для лечения и профилактики НМК, поскольку выполнение работы на условно здоровых животных без преморбидного фона, который значительно повышает риск развития сосудистых инцидентов и их фатальных исходов, существенно влияя на состояние функциональных резервов сердечно-сосудистой системы, вызывая эндотелиальную дисфункцию, повышает риск неудачной апробации препарата в клинических условиях. Необходимо отметить, что важным механизмом действия РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 в условиях ишемии головного мозга являлась их эндотелиопротективная активность. Это подчеркивает необходимость разработки и создания нового класса средств для лечения НМК – эндотелиопротекторов. Можно считать перспективным создание лекарственных средств с эндотелиопротективным действием на основе указанных соединений, которые могут найти широкое применение в комплексном лечении сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений.

ВЫВОДЫ

1. Выраженность степени повреждения головного мозга у животных при НМК и эффективность церебропротекторного действия исследуемых веществ в большей степени зависит от преморбидного состояния (НПГ, СД, возраста, стрессорных воздействий, состояния иммунной системы).

2. При профилактическом введении до окклюзии общих сонных артерий производных ГАМК (композиции фенибута с никотиновой (РГПУ-151), глутаминовой (РГПУ-152), салициловой (РГПУ-189) кислотами, β- пиридил ГАМК (РГПУ-195), композицию мефебута с L-аригинином (РГПУ-260)), производного глутаминовой кислоты (β- фенил глутаминовой кислоты (РГПУ-135)), производных хиназолина (3-[2-(1-Нафтиламино)-2-оксоэтил]-6-бромхиназолин-4(3H)-он (VMA10-17), N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA13-15)), производных гидроксibenзойных кислот (4-(N-салицилоил)аминобутановая кислота (C18), каливая соль N-(п-ацетоксибензоил)глицина (C40)) наблюдалось повышение выживаемости животных (в среднем на 43-52%), уменьшение тяжести неврологических нарушений, (поведенческого, когнитивного дефицита), степени падения мозгового кровотока и улучшение эндотелийзависимой вазодилатации (в среднем на 10,4-

19,9%). Оказываемое ими церебро- и эндотелиопротекторное действие было сопоставимо с таковыми препаратов сравнения кавинтона и цитиколина.

3. При моделировании фокальной ишемии головного мозга у животных на фоне СД, НПГ наиболее выраженное церебропротекторное действие оказали соединения РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260, тогда как эффективность соединений VMA10-17, VMA13-15, C18, C40, РГПУ-151, РГПУ-152 оказалась невысокой.

4. Лечебное курсовое 14 дневное введение вещества РГПУ-195 в дозе 44 мг/кг в условиях хронического НМК в большей степени, чем соединений РГПУ-135 (26 мг/кг), РГПУ-189 (30 мг/кг), РГПУ-260 (5,5 мг/кг)), уменьшало когнитивные и мнестические нарушения, улучшало МК (на 26,3%) и приводило к повышению ЭЗВД (на 12,9-13,7%).

5. У старых животных соединения РГПУ-135 и РГПУ-189 наиболее значительно уменьшали выраженность пострессорных неврологических нарушений, улучшали сохранение памятного следа, препятствовали повышению АД, падению мозгового кровотока, нарушению эндотелийзависимой вазодилатации, и это сочеталось с уменьшением выраженности патоморфологических изменений в головном мозге.

6. Изменение состояния иммунной системы оказывает значительное влияние на последствия и выраженность церебропротекторного действия исследуемых веществ. Так, при активированной иммунной системе, по сравнению с подавленной, наблюдалась большая выживаемость животных с ишемией головного мозга (60% и 25%, соответственно), меньшая выраженность у них неврологического дефицита ($5,3 \pm 0,9$ балла и $8,1 \pm 0,8$ балла, соответственно), более высокие показатели МК ($3,1 \pm 0,2$ и $2,89 \pm 0,2$, соответственно), низкая концентрация в сыворотке крови маркеров повреждения головного мозга – NSE ($2,41 \pm 0,3$ нг/мл и $3,44 \pm 0,4$ нг/мл) и МВР ($1,4 \pm 0,15$ нг/мл и $2,4 \pm 0,3$ нг/мл). Соединения РГПУ-135 оказывало в равной степени протекторное действие при ишемии головного мозга на фоне интактной, подавленной и активированной иммунной системы.

7. Механизм церебропротекторного действия соединений РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260 при НМК обусловлен улучшением мозгового кровообращения, эндотелиопротекторными свойствами (за счет повышения активности эндотелиальной NO-синтазы, улучшения базальной и стимулируемой продукции оксида азота, противовоспалительной и антитромботической функции эндотелия), снижением продуктов ПОЛ (ТБК-АП), повышением активности антиоксидантной системы (СОД), увеличением утилизации глюкозы мозгом, снижением агрегационной активности тромбоцитов и свертывания крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработка препаратов для лечения НМК и методология их изучения требует пересмотра и должна на этапах углубленного изучения наиболее активных веществ включать изучение фармакологической активности новых средств при моделировании НМК в условиях отягощенного преморбидного фона. Представленная методология поиска церебропротекторных препаратов (на животных с отягощенным преморбидным фоном и без него) дает возможность повысить эффективность поиска средств для профилактики и лечения НМК на этапе доклинической разработки препаратов и их внедрения в клиническую практику.

2. Проведенный сравнительный анализ 4 химических рядов соединений позволил выделить наиболее перспективные вещества для дальнейшего целенаправленного синтеза новых соединений и разработки на их основе средств профилактики и лечения острых и хронических НМК.

3. Полученные данные об особенностях действия соединений лидеров (РГПУ-135, РГПУ-189, РГПУ-195, РГПУ-260) при НМК в условиях отягощенного преморбидного фона (СД, НПГ, стресса, возрастных изменений) позволят рекомендовать дифференцировано применять исследуемые вещества в последующей клинической практике у пациентов с различными вариантами НМК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Тюренков И.Н., Литвинов А.А. Церебропротективное действие производных гамма-аминомасляной кислоты при острой ишемии головного мозга крыс // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета – 2011. – №2. – С.72-75.
2. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Петрова Е.В., Слиецанс А.А., Робертус А.И., **Волотова Е.В.** Сравнительная оценка вазодилатирующей функции эндотелия при патологиях различного генеза // Региональное кровообращение и микроциркуляция.-2011. – Т.10, №4. – С.87-90.
3. Тюренков И.Н., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Литвинов А.А., Тарасов А.С. Влияния фенибута и его композиции с никотиновой кислотой на гемостаз крыс с ишемией головного мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – №4. – С.10-12.
4. Куркин Д.В., **Волотова Е.В.**, Литвинов А.А., Бакулин Д.А., Озеров А.А. Исследование церебропротекторной и противогипоксической активности производных γ -окси- и γ -аминомасляных кислот // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – №4. – С.107-109.
5. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Слиецанс А.А., **Волотова Е.В.** Эндотелиопротекторы – новый класс фармакологических препаратов //Вестник РАМН. – 2012. – №7. – С.50-57.
6. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., **Волотова Е.В.**, Литвинов А.А., Бакулин Д.А. Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий дефицит у крыс при фокальной

- ишемии головного мозга //Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – №8. – С. 61-63.
7. **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.
8. 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.
9. **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.
10. **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Филина И.С., Тюренков И.Н. Влияние фенибута на память и поведение крыс различных возрастных групп, подвергшихся 7-дневному комбинированному стрессорному воздействию // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – №1. – С. 23-26.
11. Тюренков И.Н., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А. Нейропротекторное действие нейроглутама в условиях активации свободно-радикального окисления // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т.77, №8. – С. 16-19
12. Тюренков И.Н., Филина И.С., Гумилевский Б.Ю., **Волотова Е.В.**, Бакулин Д.А. Влияние иммунизации на адаптационные механизмы при хроническом стрессировании животных //Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7-2. – С. 368-371.
13. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., **Волотова Е.В.** Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты – Нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т.78, №9. – С. 8-12.
14. 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.
15. Антошкин О.Н., Загребин В.Л., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Федорова О.В., Терентьев А.В., Егорова А.С. Протеинопатия и апоптоз нейронов головного мозга при экспериментальной нейродегенерации у крыс// Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2015. –№ 1 (53). – С. 122-124.
16. Тюренков И.Н., Гумилевский Б.Ю., Филина И.С., Бакулин Д.А., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В. Ишемия головного мозга на фоне подавления и активации иммунитета// Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. –№9-2. – С23-29.

17. Тюренков И.Н., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В. Коррекция глиатилином нарушений рабочей и референтной пространственной памяти у старых крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015.–№6.–С. 3-6.
18. Экова М. Р., Смирнов А. В., Шмидт М. В., Тюренков И. Н., **Волотова Е. В.**, Куркин Д. В., Григорьева Н. В., Ермилов В. В., Медников Д. С. Сравнительная морфофункциональная характеристика вентрального гиппокампа у взрослых и старых крыс под влиянием комбинированного стресса // Успехи геронтологии–2016.–№1.– С. 59-67.
19. Тюренков И.Н., Литвинов А.А., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Дарманян А.П., Озеров А.А. Сравнительная церебропротекторная активность магния оксидутирата, магния сульфата и кавинтона при их профилактическом введении на модели окклюзии общих сонных артерий у крыс// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016.–№3.–С. 3-8.
20. **Волотова Е.В.**, Филина И.С., Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Тюренков И.Н. Нейропротекторное действие фенибута и нейроглутама при экспериментальной ишемии головного мозга на фоне измененной иммунореактивности// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016.–№4.–С. 18-25.

Патенты РФ

1. Брель А.К., Тюренков И.Н., Лисина С.В., Будаева Ю.Н., Родина Н.В., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Бакулин Д.А. «N-(4-Ацетоксибензоил)глицинат калия, обладающий церебропротективным действием» РФ 2556637 Оpubл. 10.07.2015
2. Брель А. К., Тюренков И. Н., Лисина С. В., Будаева Ю. Н., Родина Н. В., **Волотова Е. В.**, Куркин Д. В., Бакулин Д. А. «Динатриевая соль 3-гидроксигиппуровой кислоты, обладающая антигипоксической и церебропротективной активностью» РФ 2559875 Оpubл. 20.08.2015
3. Брель А. К., Тюренков И. Н., Лисина С. В., Будаева Ю. Н., Родина Н. В., **Волотова Е. В.**, Куркин Д. В., Бакулин Д. А. Динатриевая соль салицилуровой кислоты, обладающая церебропротективной активностью» РФ 2570644 Оpubл.10.12.2015
4. Берестовицкая В.М., Васильева О.С., Остроглядов Е.С., Петров В.И., Тюренков И.Н., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В. «Средство, обладающее нейропротекторным действием в условиях ишемического нарушения мозгового кровообращения» РФ 2586301 Оpubл. 10.06.2016
5. Берестовицкая В. М., Васильева О. С., Остроглядов Е. С., Петров В. И., Тюренков И. Н., **Волотова Е. В.**, Куркин Д. В. «Средство, обладающее церебропротекторным, эндотелиопозитивным и антитромботическим действием» Регистрационный № 2015123764 от 17.06.2015 (получено положительное решение о выдаче патента 06.06.2016)

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. Тюренков И.Н., **Волотова Е.В.** Изучение влияния соединения РГПУ-201 на систему функционального состояния гемостаза у крыс // Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)/ материалы международной научной конференции. – Ярославль: Изд-во ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 2009. – С.97.
2. Куркин Д. В., Литвинов А. А., **Волотова Е. В.** Изучение влияния нового производного ГАМК РГПУ-189 на выживаемость животных при экспериментальной ишемии головного мозга // Актуальные проблемы

экспериментальной и клинической медицины: материалы 69-ой открытой научно-практической конференция молодых учёных и студентов с международным участием – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2011. – С.199.

3. Робертус А.И., Воронков А.В., **Волотова Е.В.** Изучение соединения РГПУ-189 на антитромботическую функцию эндотелия при возрастной недостаточности половых гормонов // 2-ой Всероссийский научно-практический семинар для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии», Волгоград – 2010. – С.106-107.

4. Мазина Н.В., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В. Влияние нового производного ГАМК на параметры мозгового кровотока // 3-й Всероссийский научно-практический семинар для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии», Волгоград – 2011. – С. 47-48.

5. Литвинов А.А., Куркин Д.В., **Волотова Е.В.** Влияние производных гамма-амино- и оксимасляной кислот на когнитивные функции у животных, перенесших глобальную церебральную ишемию // 3-й Всероссийский научно-практический семинар для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии», Волгоград – 2011. – С. 46-47.

6. **Волотова Е.В.**, Мазина Н.В. Влияние нового соединения РГПУ-217 на мозговое кровообращение в условиях ишемического повреждения головного мозга // БГМУ: 90 лет 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.

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

8. Мазина Н.В., **Волотова Е.В.** Влияние нового производного глутаминовой кислоты на выживаемость животных в условиях экспериментальной ишемии головного мозга крыс // 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.

9. Мазина Н.В., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В. Влияние нового производного ГАМК – РГПУ-195 на вазодилатирующую функцию эндотелия при экспериментальной ишемии головного мозга // 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.

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

11. **Волотова Е.В.**, Мазина Н.В., Бакулин Д.А., Петрова Е.В., Шишлянникова О.Г. Изучение действия производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот при ишемии головного мозга в условиях блокады синтеза оксида азота

//Казань IV Съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» 18-21 сентября 2012. – Казань 2012. – С. 38.

12. Бакулин Д.А., Куркин Д.В., **Волотова Е.В.** Изучение влияние производных гамма-аминомасляной кислоты на тромбоцитарный компонент гемостаза у животных с фокальной ишемией головного мозга. //4-й Всероссийский научно-практический семинар для молодых ученых «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств», Волгоград – 2012. – С.98.

13. Бакулин Д.А., Озеров А.А., Тюренков И.Н., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Арчакова Ю.В., Шматова Е.Н. Влияние производных хиназолина на мозговой кровотоков крыс с необратимой двусторонней перевязкой общих сонных артерий // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2013. – Т.11, Спецвыпуск. – С.21.

14. **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Тюренков И.Н. Изучение нейропротективных и эндотелиотропных свойств нового производного гамма-аминомасляной – салифена при фокальной ишемии у крыс // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2013. – Т.11, Спецвыпуск. – С.35.

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

16. Бакулин Д.А., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В. Влияние композиции фенибута с никотиновой кислотой на функциональное состояние эндотелия животных с фокальной ишемией головного мозга//Вестник ВолГМУ: приложение (Материалы V Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Геномные и протеомные технологии при создании лекарственных средств»). – 2014. – С. 9-10.

17. Тюренков И.Н., Филина И.С., **Волотова Е.В.**, Куркин Д.В., Бакулин Д.А. Влияние иммунного статуса организма на церебропротекторные эффекты при ишемии гм // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015.–Т. 78, №S.– С. 59.

18. Тюренков И.Н., Смирнов А.В., Григорьева Н.В., Шмидт М.В., Экова М.Р., Куркин Д.В., **Волотова Е.В.** Характеристика структурных изменений гиппокампа старых крыс при комбинированном стрессе и его фармакологической коррекции // Фармация и фармакология. – 2015. – № 5s. – С. 118-119.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД – артериальное давление
 АЧТВ – активированное частично тромбопластиновое время
 ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
 ДА – двигательная активность
 ИРМ – иммунореактивный материал
 ИС – иммунная система
 ЛО – ложнопериоперированные животные
 ЛП – латентный период
 МК – мозговой кровотоков
 НМК – нарушение мозгового кровообращения
 НППГ – недостаточность половых гормонов
 ОИА – ориентировочно-исследовательская активность
 ОП – открытое поле
 ОСА – окклюзия общих сонных артерий
 ОСМА – окклюзии средней мозговой артерий

ПВ – протромбиновое время
 ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
 ПОЛ – перекисное окисление липидов
 СД – сахарный диабет
 СОД – супероксиддисмутаза
 СРБ – С-реактивный белок
 ТВ – тромбиновое время
 ТЭИ – тест экстраполяционного избавления
 УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания
 ФВ – фактор Виллебранда
 ХНМК – хроническое нарушение мозгового кровообращения
 ЦНС – центральная нервная система
 ЭД – эндотелиальная дисфункция
 ЭЗВД – эндотелийзависимая вазодилатация
 ЭНВД – эндотелийнезависимая вазодилатация

Волотова Елена Владимировна

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО
КРОВООБРАЩЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ
(В ЭКСПЕРИМЕНТЕ)

АВТОРЕФЕРАТ

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология