

На правах рукописи

Зайка Тамара Олеговна

Экспериментальные исследования церебропротективной активности и ее связи с антидепрессивным действием фармакологических веществ производных бензимидазола и оксиндола

14.03.06 Фармакология и клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2020

Работа выполнена в Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького»

Научный руководитель: Абрамец Игорь Игоревич, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии им. профессора И. В. Комиссарова ГОО ВПО Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Официальные оппоненты:

Воронина Татьяна Александровна, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова».

Батищева Галина Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко» Минздрава России.

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России.

Защита состоится: «__» _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Волгоград, пл. Павших бойцов, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.volgmed.ru ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Бугаева Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Депрессивные расстройства – рецидивирующие заболевания, являющиеся континуумом ряда синдромов [Kessler R. C. et al., 2003], существенно нарушающих качество жизни больных и даже сопровождающиеся появлением суицидальных идей. Гипотезы патогенеза депрессивных расстройств объясняют главным образом происхождение отдельных синдромов депрессии, но не раскрывают основной механизм депрессивных расстройств. При наличии современных эффективных антидепрессантов, около трети пациентов остаются полностью или частично устойчивыми к лечению [Быков Ю. В. и др., 2013]. Сетевая нейропластическая гипотеза депрессивных расстройств объясняет, что в основе депрессии лежит атрофия нейронных ансамблей в кортикальных и лимбических структурах мозга, которые контролируют эмоции и настроение [Duman R. S. et al., 2006; Krishnan V. et al., 2010; Lucassen P. J. et al., 2010; Kang H. J. et al., 2012; Knowland D. et al., 2017; Liston C. et al., 2006; McEwen B. S. et al., 2012]. Дефицит нейропластичности приводит к развитию депрессивной симптоматики [Duman R. S. et al., 2012].

Возможно, депрессивные расстройства, наряду со средствами специфической терапии, как и нейротрофические заболевания можно лечить препаратами с нейротрофическим и нейрометаболическим действием, стимулирующими репаративные процессы, и с церебропротективным действием (ноотропы), стимулирующими обменные процессы в мозге [Иллариошкин С. Н. и др., 2006; Рославцева В. В. и др., 2015].

Степень разработанности проблемы:

Используемые в настоящее время антидепрессанты, относящиеся к различным функциональным классам, обладают умеренным церебропротективным, нейротрофическим и репаративным действием [Абрамец И. И. и др., 2010; Абрамец И. И. и др., 2011; Багаури О. В. и др., 2012]. Классические антидепрессанты только при хроническом введении повышают уровень BDNF и других нейротрофинов в мозге [Гудашева Т. А. и др., 2017], а этого недостаточно для лечения резистентных форм депрессии. Для лечения таких форм используют препараты, не являющиеся истинными антидепрессантами [Berman R. M. et al., 2000; Gerhard D. M. et al., 2016; Lepack A. E. et al., 2014; Lorrain D. S. et al., 2003], регулирующие процесс трансляции белков и синаптическую пластичность [Koike H. et al., 2011; Li N. et al., 2010; Danielle M. Gerharda, 2016] путем усиления (аугментации) действия типичных антидепрессантов (наиболее часто СИОЗ серотонина) другими психофармакологическими средствами (препараты лития, вальпроаты, некоторые атипичные антипсихотики). Все они обладают достаточным церебропротективным действием [Chuang D. M. et al., 2006]. В литературе имеются немногочисленные данные о том, что

нейрометаболический церебропротектор пирацетам улучшает течение депрессивных расстройств [Востриков В.В., 2017; Смулевич А. Б., 2017], Изучаемые в работе диакамфа гидрохлорида и соединения R-86 также проявляют церебропротективное действие. Изучить их действия не только с пирацетамом, как препаратом сравнения, но и с классическими антидепрессантами амитриптилином, имипрамином и другими препаратами. Именно эти обстоятельства определили цели и задачи этой работы.

Цель исследования:

Изучить спектры церебропротективной активности диакамфа и соединения R-86 и выяснить наличие у них антидепрессивного действия и связи между церебропротективной активностью и их антидепрессивным действием на двух разновидностях поведенческой депрессии.

Задачи исследования:

1. В исследованиях на срезах гиппокампа крыс с помощью электрофизиологических методов оценить спектры церебропротективной активности диакамфа гидрохлорида, соединения R-86 и препаратов сравнения по их способности противодействовать повреждениям пирамидных нейронов, вызываемым эксайтотоксическим действием, оксидативным стрессом и аноксией/нейроагликемией.

2. Выявить влияние диакамфа, соединения R-86, имипрамина и амитриптилина на функциональные нарушения в пирамидных нейронах поверхностных и глубоких слоев префронтальной коры при моделировании поведенческой депрессии разного генеза.

3. Изучить влияние хронически вводимых диакамфа, соединения R-86, препаратов сравнения и антидепрессантов на основные проявления вызванной хроническим плавательным стрессом поведенческой депрессии у крыс.

4. Исследовать влияние хронически вводимых диакамфа, соединения R-86, препаратов сравнения и антидепрессантов на основные проявления вызванной хроническим воспалением мягких тканей спины поведенческой депрессии у крыс.

5. Выявить влияние диакамфа и соединения R-86 на антидепрессивное действие имипрамина, амитриптилина и кетамина при двух различных формах поведенческой депрессии.

6. Проанализировать функциональную связь между церебропротективным и антидепрессивным действием диакамфа, соединения R-86 и других исследуемых веществ.

Научная новизна исследования:

Впервые изучены спектры церебропротективного действия диакамфа и соединения R-86 на нейрональном уровне при различных повреждающих воздействиях – глутаматной нейротоксичности, аноксии и оксидативном стрессе. Впервые установлено, что вызываемые депрессогенными

воздействиями повреждения пирамидных нейронов поверхностных и глубоких слоев прелимбической коры (ПЛК) и передней поясной коры (ППК) ослабляются диакамфом, соединением R-86 и антидепрессантами (имипрамином, амитриптилином). Впервые показано, что обладающие церебропротективной активностью диакамф и соединение R-86 при хроническом введении крысам оказывают выраженное возрастающее со временем антидепрессивное действие при поведенческой депрессии, вызванной плавательным стрессом и хроническим воспалением. Впервые выяснено, что антидепрессивное действие диакамфа и соединения R-86 определяется их антиоксидативным и антиэксайтотоксическим действием; антианоксическое действие исследуемых веществ не играет роли в их антидепрессивном действии.

Теоретическая и практическая значимость работы:

В данном исследовании разработаны представления о том, что обладающие церебропротективной активностью лекарственные и фармакологические вещества улучшают функциональное состояние мозга и предотвращают или обращают вызываемые хроническим стрессом и воспалением функциональные повреждения лимбических структур мозга. Это определяет их антидепрессивное действие при моделировании поведенческой депрессии различного генеза. С другой стороны, выявление того, что пираретам и соединение R-86 потенцируют оптимизирующее поведение действие антидепрессантов в экспериментальных условиях, позволяет рекомендовать вещества с церебропротективной активностью для усиления действия антидепрессантов при лечении резистентных форм депрессии. Способность соединения R-86 проявлять при хроническом введении собственную антидепрессивную активность и усиливать действие антидепрессантов свидетельствует о возможности и перспективности разработки на его основе лекарственного вещества для потенцирования действия традиционных препаратов. Препараты типа диакамфа, которые не всегда усиливают действия антидепрессантов, могут быть рекомендованы для пролонгирования продолжительности ремиссии при депрессии.

Результаты проведенного исследования включены в материалы лекций и практических занятий для студентов и курсантов на кафедрах фармакологии и клинической фармакологии, неврологии и медицинской генетики; психиатрии, наркологии и медицинской психологии; психиатрии, психотерапии, медицинской психологии и наркологии, нормальной и патологической физиологии ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО. Методические подходы к поиску, доклиническому фармакологическому исследованию веществ с потенциальным церебропротекторным и возможным антидепрессивным действием используются в научно-исследовательской работе кафедр фармакологии и клинической фармакологии ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО, и кафедры физиологии человека и животных ГОО ВПО ДОННУ.

Методология и методы исследования:

В приведенном исследовании использовали комплексный подход к сравнительному изучению нейропротективных и антидепрессивных свойств диакама гидрохлорида и соединения R-86 и клинически используемого пираретама. В исследованиях на срезах гиппокампа крыс изучали нейропротективную активность исследуемых веществ при воздействии на срезы таких повреждающих воздействий, как глутаматная эксайтотоксичность, аноксия и нейроагликемия, а также оксидативный стресс. В исследованиях на срезах медиальной префронтальной коры изучали характер нарушений синаптической передачи и синаптической пластичности при моделировании поведенческой депрессии различного генеза и влияние на эти нарушения антидепрессантов и церебропротекторов. В поведенческих исследованиях изучали влияние применяемых веществ на показатели поведенческой депрессии у крыс, вызываемой плавательным стрессом и хроническим воспалением. Дизайн исследования соответствовал международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). В качестве теоретической и методологической основы использовались методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме [Гарибова Г.А., Воронина Т. А., 2017; Спасов А.А. и др., 2014; Митюшев М. И. и др., 1986; Тюренков И.Н. и др., 2013, Benelli A, et al.,1999; Хабриев Р. У., 2005], с применением рекомендованных методов статистической обработки результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. У диакама и производного оксиндола – соединения R-86 в исследованиях на срезах гиппокампа крыс выявлена церебропротективная активность, которая проявлялась индивидуальным набором антиэксайтотоксического, антиоксидативного и антианоксического эффектов.

2. Депрессогенные воздействия – хроническое воспаление и обусловленный введением резерпина дефицит моноаминов в мозге – вызывают нарушения релейных и пластических свойств глутаматергических синапсов поверхностных и глубоких слоев прелимбической и передней поясной коры крыс. Существенно, что эти повреждения ослабляются антидепрессантами и церебропротекторами, т. е. являются одной из причин развития депрессивного фенотипа поведения.

3. Церебропротекторы диакама и соединение R-86 обладают антидепрессивным действием при хроническом введении в условиях поведенческой депрессии у крыс, вызываемой плавательным стрессом и хроническим воспалением. Это действие проявлялось уменьшением времени иммобилизации крыс в плавательном тесте Порсолта, но увеличением показателя предпочтения потребления раствора сахарозы.

4. Церебропротекторы диакамф и соединение R-86 помимо антидепрессивного действия обладают способностью усиливать влияние классических (имипрамин и амитриптилин) и быстродействующих (кетамин) антидепрессантов на основные проявления вызываемой плавательным стрессом и хроническим воспалением поведенческой депрессии у крыс.

5. Антидепрессивное действие диакамфа и соединения R-86, а также используемых антидепрессантов обусловлено такими проявлениями их церебропротективной активности, как антиэксцитотоксическое и антиоксидантное действие; способность исследуемых веществ ослаблять аноксические повреждения нейронов несущественна для их влияния на поведенческую депрессию.

Личный вклад:

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по изучаемой проблеме, выполнена экспериментальная часть работы, проведена статистическая обработка и описание результатов исследования. Автор принимал участие в формулировке цели, задач, выводов и научно–практических рекомендаций. При его участии проведен подбор методов и общей структуры исследования, разработаны протоколы экспериментов.

Степень достоверности и апробация результатов:

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, применением специализированного и высокотехнологического оборудования, общепринятых методов и критериев статистической обработки данных. Материалы исследования докладывались и обсуждались на 77, 79, 80–м Международных медицинских конгрессе молодых ученых "Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины" г. Донецк. По материалам диссертации опубликованы 12 печатных работ, в том числе 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки Российской Федерации.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 205 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, 4 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, научно-практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 228 источников, из них 32 отечественных и 196 зарубежных авторов. Работа проиллюстрирована 34 таблицами и 16 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава посвящена литературному обзору влияния на лимбические структуры мозга стресса и воспаления, являющихся факторами провоцирующими и утяжеляющими депрессивный синдром.

Во **второй главе** рассматриваются материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 260 нелинейных крысах, полученных из питомника Киевского Института Физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины. Все животные содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в соответствии с рекомендациями ВОЗ по экспериментальной работе с использованием животных. Проведение экспериментов осуществлялось в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук и международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Исследование было одобрено региональным комитетом по биоэтике Донецкого медицинского национального университета им. М. Горького (протокол № 7 от 15 ноября 2016 г.).

Поведенческие исследования. Для оценки эмоциональных и мотивационных составляющих целостных поведенческих актов исследовали поведение животных в условиях вынужденного плавания [Porsolt R. D., 1978]. Крыс помещали в аквариумы высотой 50 см, заполненные водой на 2/3 высоты; с температурой воды 22-25°C. Учитывали время иммобилизации крыс, «поведение отчаяния», проявлявшееся вертикальным положением крыс в воде, пассивным плаванием без движений конечностями, передние лапы были прижаты к груди, задние вытянуты. Регистрировали продолжительность иммобилизации в секундах на протяжении последних 180 с сеанса вынужденного плавания продолжительностью 300 с. Для выявления эмоциональных нарушений – ангедонии – использовали тест предпочтения сахарозы отражающий пищевое вознаграждение [Benelli A. et al., 1999] В первые сутки крыс помещали в индивидуальные клетки с двумя поилками, заполненными 1% раствором сахарозы. Следующие сутки в одной поилке была вода, а в другой – раствор сахарозы. 23 часа третьих суток животных подвергали пищевой и водной депривации, а затем на 60 мин. в клетку возвращали предварительно взвешенные 2 поилки, заполненные водой и раствором сахарозы. По истечению часа поилки взвешивали. В последующие 2 часа четвертых суток животные получали пищу и воду, после чего на 21 час их лишали пищи и воды. Затем опять на 1 час возвращали поилки и определяли процент (%) предпочтения потребления раствора сахарозы (П), по формуле:
$$П = \frac{\text{вес потребленного раствора сахарозы}}{\text{вес потребленной жидкости}} \times 100\%$$

Электрофизиологические исследования. Для регистрации электрической активности нейронов переднего мозга, вовлеченных в реализацию когнитивных, эмоциональных и мотивационных процессов, исследования проводили в переживающих срезах дорсального гиппокампа (ДГ) и медиальной префронтальной коры (мПФК). Регистрация

электрической активности осуществлялась с помощью стандартной установки для электрофизиологических исследований [Митюшев, М. И., 1986].

Приготовление срезов: крыс наркотизировали кетаминем внутривенно в дозе 50 мг/кг и подвергали декапитации. После этого вскрывали череп и из него извлекали головной мозг, который сразу же охлаждали раствором для препарирования. Срезы мПФК выделяли из переднего полюса, а ДГ – из заднего полюса мозга. Соответствующие блоки мозга фиксировали с помощью цианакрилового клея и агарового блока на площадке вибратора (Campden Instruments). Последняя находилась в ванночке, заполненной охлажденным и насыщенным карбогеном (смесь 95% O₂ и 5% CO₂) раствором для препарирования. С помощью вибратора готовили продольные срезы мозга, содержащие прелимбическую и инфралимбическую области мПФК, либо ДГ толщиной 400 – 450 мкм. Далее из срезов выделяли необходимую для исследований область, которую переносили в инкубационную камеру объемом 3 мл. Через 60 – 90 мин пребывания в инкубационной камере срезы мозга переносили для электрофизиологических исследований в рабочую камеру объемом 0,5 мл и фиксировали на дне камеры стимулирующим электродом.

Регистрация электрической активности нейронов: с помощью стеклянных микроэлектродов, регистрировали популяционные возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) пирамидных нейронов области СА1 ДГ и V слоя мПФК. Локализация раздражающих электродов и отводящих микроэлектродов в каждой конкретной ситуации имела свои особенности.

Работая со срезами ДГ, биполярный нихромовый стимулирующий электрод располагали в радиальном слое – в области проекций коллатералей Шаффера. Микроэлектрод также располагали в радиальном слое ближе к зубчатой извилине. Коллатерали Шаффера стимулировали прямоугольными импульсами тока возрастающей интенсивности длительностью 0,1 мс частотой 0,1 Гц для получения кривой зависимости амплитуды постсинаптических ответов от интенсивности пресинаптической стимуляции.

В срезах мПФК стимулирующий электрод располагали во II/III слоях прелимбической области, а регистрирующий микроэлектрод локализовали в V слое коры ближе ко II/III слоям, регистрировали пВПСП, амплитуда которых почти линейно возрастала при увеличении интенсивности пресинаптической стимуляции.

В срезах ППК стимулирующий электрод располагали во II/III слоях передней поясной коры (АСС), а регистрирующий микроэлектрод локализовали в V слое коры ближе ко II/III слоям. При стимуляции проходящих во II/III слоях таламических афферентов в пирамидных нейронах V слоя мПФК регистрировали пВПСП, амплитуда которых почти

линейно возрастала при увеличении интенсивности пресинаптической стимуляции.

Поскольку высвобождаемый из пресинаптических аксонных терминалей глутамат активирует две популяции постсинаптических ионофорных глутаматных рецепторов АМПА и НМДА, которые выполняют в глутаматергических синапсах различные функции, имеется возможность выделить два компонента ВПСП пирамидных нейронов. НМДА компонент пВПСП пирамидных нейронов выделяли фармакологически. Для этого срезы мозга суперфузировали раствором Кребса со сниженной до 0,2мМ концентрацией Mg^{2+} и добавлением 10 мкМ блокатора АМПА рецепторов – 6,7–динитрохиноксалин–2,3–диола (DNQX), 50 мкМ неконкурентного блокатора ГАМК_A рецепторов пикротоксина и 1мкМ ко–агониста НМДА рецепторов глицина. АМПА компонент пВПСП пирамидных нейронов выделяли путем суперфузии срезов мозга раствором Кребса, содержащим конкурентный блокатор НМДА глутаматных рецепторов D–2–амино–5–фосфоновалериановую кислоту (D–AP5) в концентрации 50 мкМ.

Помимо этого, исследовали пластичность глутаматергических синапсов пирамидных нейронов V слоя мПФК – длительную потенциацию синаптической передачи. Длительную потенциацию вызывали четырехкратной с интервалом 10 с тетанической стимуляцией таламических афферентов, проходящих во II/III слоях, частотой 100 Гц длительностью 1 с; интенсивность стимуляции подбиралась таким образом, чтобы амплитуда пВПСП составляла ~ 1/3 от максимальной. После нанесения тетанической стимуляции амплитуду пВПСП пирамидных нейронов регистрировали в течение 30 мин.

Для выяснения природы (пре– или постсинаптическая) наблюдаемых изменений амплитуд пВПСП пирамидных нейронов использовали параметр отношение парного облегчения. Каждая серия электрофизиологических опытов на срезах мозга выполнена на 6–9 срезах мозга, взятых от 3–4 животных.

Моделирование повреждений пирамидных нейронов гиппокампа.

Эксайтотоксическое действие НМДА исследовали по методу, предложенному Liu Y., et al. [2007]. Для этого на срезы гиппокампа воздействовали 50 мкМ НМДА в присутствии 1 мкМ глицина в течение 15 мин. После этого срезы переносили в инкубационную камеру, где они пребывали не менее 1 часа. В электрофизиологические исследования срезы брались через 1 час после прекращения действия НМДА. Аноксию и агликемию моделировали по методу Tian G. and Baker A. J. [2006] – срезы помещали в камеру с атмосферой азота (95 % N₂ и 5 % CO₂ в раствор Кребса, где глюкоза была замещена эквивалентным количеством маннита на 7,5 мин при температуре 32°C. Затем срезы переносили в инкубационную камеру в аэрируемый раствор Кребса. В

электрофизиологические исследования срезы брали через 1 час после прекращения процедуры аноксии и агликемии. Оксидативный стресс моделировали по методу De Almeida L. M., et al. [2008], для чего на срезы воздействовали H_2O_2 в концентрации 1 мМ в течение 30 мин. После чего срезы переносили в инкубационную камеру и через 1 час их брали в исследования.

Моделирование экспериментального депрессивного синдрома, вызванного неизбежным плавательным стрессом. Экспериментальный депрессивный синдром моделировали по методу Sun P., et al., 2011 [Liang Jing et al., 2015; Gal Richter–Levin et al., 2018]. Для этого крыс ежедневно на протяжении пяти дней помещали в воду в аквариум высотой 50 см, заполненный водой на 2/3 высоты при температуре 22–24°C на 10 минут после определения исходных показателей времени иммобилизации в тесте Порсолта и % предпочтения потребления раствора сахарозы крысами по сравнению с водой. Через 10 и 20 суток после последнего сеанса плавания определяли параметры, характеризующие мотивационное и гедоническое поведение, путем проведения теста Порсолта и теста предпочтения раствора сахарозы по сравнению с водой.

Моделирование вызванного хроническим воспалением депрессивного синдрома. Хроническое асептическое воспаление у крыс вызывали по методу, предложенному Тринусом Ф. П. [1975]. Животным под кожу спины вводили 0,5 мл 9% уксусной кислоты; сразу после этого крысам внутрибрюшинно вводили декстран в дозе 200 мг/кг. Через 2–3 дня на месте введения уксусной кислоты появлялся воспалительный инфильтрат. Об интенсивности воспалительного процесса судили по увеличению лейкоцитов в крови (до $12,65 \pm 1,14 \cdot 10^9$ /л, в сравнении с контролем $4,77 \pm 0,52 \cdot 10^9$ /л), размеру воспалительного инфильтрата (до 3–х см в диаметре). Кровь для исследований брали из хвостовой вены. К проведению поведенческих исследований (плавательному тесту Порсолта, тесту предпочтения раствора сахарозы по сравнению с водой) приступали на десятые и двадцатые сутки после введения крысам флогогенов.

Моделирование вызванной введением резерпина поведенческой депрессии. Обусловленную «вымыванием» моноаминов из тканей головного мозга поведенческую депрессию у крыс воспроизводили по методу, предложенному Машковским М. Д. и др. [1983]. Крысам в/б вводили резерпин в дозе 1 мг/кг. Через сутки оценивали выраженность поведенческой депрессии по уровню птоза, выраженности гипокинезии в открытом поле, по степени снижения ректальной температуры. После оценки изменений поведения животных брали в электрофизиологические исследования.

Используемые фармакологические вещества. Для выяснения нейрофизиологической и нейрохимической природы наблюдаемых поведенческих и нейрональных эффектов использовали следующие

вещества: Резерпин (Gideon Richter, Венгрия) вводили внутривентрикулярно в дозе 1 мг/кг; декстран в виде препарата Полиглокин (Красфарма, РФ), вводили внутривентрикулярно в дозе 200 мг/кг; антидепрессанты, ингибиторы обратного захвата норадреналина и серотонина Имипрамин (EGYS, Венгрия) и Амитриптилин (ФГУП «Московский эндокринный завод» РФ) вводили внутривентрикулярно в дозе 5 мг/кг и 20 мг/кг; церебропротектор (ноотроп) Пирацетам (НИКО, Украина) вводили внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг и 100 мг/кг; Диакамф ((±)цис-3-(2'-бензилмедазолил)-1,2,2-триметилциклопентанкарбоновая кислота) вводили внутривентрикулярно 5 и 10 мг/кг (предоставлен Национальным фармацевтическим университетом (НФаУ), Украина); соединения R-86 — производное 3,2'-спиро-пирроло-2-оксидола вводили внутривентрикулярно 5 и 10 мг/кг (предоставлен НФаУ, Украина). Конкурентный блокатор глутаматных НМДА рецепторов D-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота (D-AP5; RBI, США), в концентрации 50 мкМ; конкурентный блокатор глутаматных АМПА рецепторов 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион (RBI, США), в концентрации 10 мкМ; неконкурентный блокатор ГАМК_A рецепторов пикротоксин (Merk, ФРГ), в концентрации 100 мкМ; ко-агонист НМДА рецепторов глицин (Олайнфарма, Литва) в концентрации 1 мкМ – все 4 вещества воздействовали на срезы в течении 20 мин, N-метил-D-аспартат 50 мкМ (Tocris Cookson, Великобритания), неконкурентный неизбирательный блокатор глутаматных НМДА рецепторов кетамин (Биолек, Украина), вводили внутривентрикулярно в дозе 5 мг/кг однократно и 50 мг/кг, однократно для анестезии.

Статистическая обработка результатов. Результаты исследований обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с помощью лицензионной программы «Medstat» [Лях Ю. Е., 2012; Петри А., 2003]. Для выявления различий между выборками применяли t-критерий Стьюдента для парных и с поправкой Бонферрони – для множественных сравнений, критерии Краскела–Уоллиса с пост-хок тестом Данна, Манна–Уитни для множественных сравнений. Статистически достоверными различия считали при значимости $p < 0,05$. Для оценки вероятных связей между церебропротективной и антидепрессивной активностью исследуемых веществ при поведенческой депрессии на двух разновидностях поведенческой депрессии использовали коэффициенты корреляций рангов по Спирмену.

В главе три в опытах на переживающих суперфузируемых срезах дорсального гиппокампа крыс исследовали спектры церебропротективной активности диакамфа гидрохлорида, соединения R-86, позитивного референтного препаратов сравнения пирацетама и негативного референтного препарата дексаметазона по способности этих веществ изменять влияние повреждающих воздействий на синаптическую передачу между коллатеральными Шаффера (аксоны пирамидных нейронов области

СА3) и дендритами пирамидных нейронов области СА1 в радиальном слое гиппокампа. Воздействие на срезы гиппокампа процедуры аноксии/агликемии в течение 7,5 мин вызывало необратимые повреждения пирамидных нейронов гиппокампа, судя по уменьшению амплитуд субмаксимальных пВПСП почти на 90% (рис. 1).

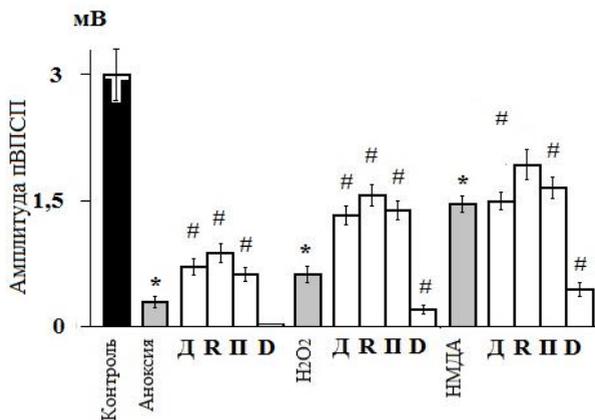


Рис. 1. Спектры церебропротективной активности хронически вводимых диакамфа (Д), соединения R-86 (R), парацетама (П) и дексаметазона (D), оцениваемые по их способности изменять повреждения пирамидных нейронов гиппокампа, вызываемые аноксией/агликемией, оксидативным стрессом (H₂O₂) и эксайтотоксическим действием НМДА. В каждой серии использовали по 6–8 срезов, взятых от 3–4 крыс. По вертикальной шкале – амплитуда пВПСП в мВ. * – величины достоверно отличаются от контроля, # – от повреждающего воздействия при p<0,05

На фоне хронического введения 10 мг/кг диакамфа и соединения 10 мг/кг R-86 эта же процедура достоверно уменьшала амплитуду пВПСП в меньшей степени на 78,6 и 73,0% соответственно и препарата сравнения хронически вводимого парацетама 100 мг/кг также до 83,3% (рис. 1). В тоже время, вводимый субхронически на протяжении 2 дней в дозе 0,5 мг/кг референтный негативный препарат дексаметазон полностью угнетал синаптическую передачу в радиальном слое области СА1 гиппокампа крыс (рис. 1).

В условиях оксидативного стресса при воздействии на срезы 1 мМ H₂O₂ амплитуда пВПСП пирамидных нейронов уменьшалась на 79,4%. Диакамф и соединение R-86 достоверно ослабляли повреждение нейронов, судя по амплитуде на 55,7 и 48,2% соответственно, а парацетама на 53,5% (рис. 1). Воздействие дексаметазона на крыс в дозе 0,5 мг/кг существенно усиливало повреждающее действие оксидативного стресса на пирамидные нейроны области СА1 гиппокампа в 3,3 раза (рис. 1).

Наименее интенсивное повреждение пирамидных нейронов гиппокампа вызывало воздействие на срезы НМДА в течение 15 мин – амплитуда пВПСП уменьшалась на 51,5%. Диакамф не оказывал достоверного влияния на эксайтотоксические повреждения нейронов (рис. 1). Соединение R-86 и пирацетам ослабляли эксайтотоксические повреждения пирамидных нейронов, поскольку снижение амплитуд пВПСП на их фоне составило 35,6 и 42,1 % соответственно (рис. 1). В 2,7 раза усиливалось эксайтотоксическое повреждение пирамидных нейронов гиппокампа на фоне субхронического воздействия негативного референтного препарата дексаметазона (рис. 1).

Таким образом, исследуемые фармакологические вещества диакамф и соединение R-86, как и позитивный референтный препарат пирацетам, обладают церебропротективной активностью, которая проявляется в разной степени выраженной у каждого препарата способностью уменьшать повреждение пирамидных нейронов гиппокампа, вызываемые эксайтотоксическим действием, депривацией кислорода и глюкозы, а также оксидативным стрессом. Однако воздействие высоких доз глюкокортикоидов (дексаметазона) ухудшает функциональное состояние нейронов гиппокампа и существенно увеличивает их чувствительность к разнообразным повреждающим процедурам.

В главе **четыре** описано, что в медиальной префронтальной коре (мПФК) различают 4 области вдоль дорсовентральной оси: медиальная прецентральная область (вторая фронтальная область – Fr2), ППК, ПЛК и ИЛК [Heidbreder C. A. et al., 2003]. Одной из основных функций мПФК является поддержание бодрствующего состояния мозга, контроль последовательности событий и реализация оперативной (рабочей) памяти. Взаимодействуя со структурами лимбической системы мПФК регулирует эмоции и настроение, вовлечена в реакции привыкания, в обучение, регуляцию долгосрочной памяти и накопление жизненного опыта [Baddeley A. , 1992].

Нарушения нейропластичности в пирамидных нейронах 5 слоя ПЛК при воздействии депрессогенной процедуры – хронического воспаления – приведены на рисунке 2. Они проявляются снижением амплитуд ВПСП пирамидных нейронов в среднем на 0,36 мВ (рис. 2, слева внизу), что приводит к снижению суммационной способности нейронов и угнетению обработки информации, ослабляется синаптическая пластичность, судя по угнетению развития длительной потенциации (ДП) синаптической передачи. Так, через 30 мин после стимуляции синаптических входов у контрольных животных прирост амплитуды ВПСП составлял 35,4%, а на фоне хронического воспаления – 8,2% (рис. 2, справа). На фоне хронического введения антидепрессанта имипрамина и диакамфа наблюдали уменьшение степени угнетения амплитуд ВПСП пирамидных нейронов и восстановление развития ДП синаптической передачи.

Подобные результаты получены при использовании другой модели депрессивного поведения, вызванного введением резерпина. Изменения релейных и пластических свойств синапсов ассоциативных нейронов 2/3 слоев ПЛК и влияние на эти изменения антидепрессантов и церебропротекторов были такими же, но выраженными в меньшей степени.

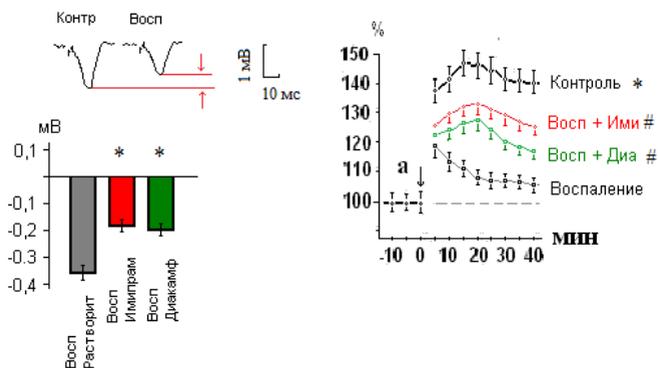


Рис. 2. Влияние хронического введения имипрамина и диакамфа в дозах 20 и 10 мг/кг, соответственно, на функциональные нарушения релейных и пластических свойств синапсов пирамидных нейронов 5 слоя ПЛК при хроническом воспалении. Справа – изменения амплитуд пВПСП пирамидных нейронов во времени, слева – сравнение амплитуды пВПСП пирамидных нейронов, а – исходная амплитуда. Отличия от исходного уровня (*) и повреждающего воздействия (#) достоверны при $p < 0.05$.

Передняя поясная кора (ППК) участвует в формировании эмоциональных состояний, в оценке мотивационного содержания и эмоциональной валентности внутренних и внешних стимулов, а также в экспрессии внутренних состояний и регулирует ряд процессов, в первую очередь целенаправленное поведение [Yoshimura S. et al., 2010].

При депрессивном синдроме существенно возрастает функциональная связь между ростральной ППК и миндалинами только во время негативных самооценочных процессов [Cullen K. R. et al., 2010]. Наблюдают также повышение функциональной активности и нарушение деактивации ростральной ППК и миндалин, что делает невозможной коррекцию негативных эмоциональных состояний [Abramets I. I. et al., 2013].

При вызываемом резерпином депрессивном фенотипе поведения наблюдали увеличение амплитуд ВПСП пирамидных нейронов 2/3 слоев ППК в среднем на 0,22 мВ (рис. 3, слева внизу), что способствует усилению суммации ВПСП и развитию застойного возбуждения нейронов, но угнетению развития ДП синаптической передачи (рис. 3, справа). В то же время, воздействие резерпина и хронического воспаления на фоне хронического введения антидепрессанта amitriptyline и нейропротектора

соединения R-86 вызывало достоверно меньший прирост амплитуд ВПСР ассоциативных пирамидных нейронов ППК и способствовало восстановлению синаптической пластичности, усиливая развитие ДП синаптической передачи (рис. 3, справа). В проекционных пирамидных нейронах 5 слоя ППК при воздействии на крыс хронического воспаления и резерпина выявлено только угнетение развития ДП синаптической передачи.

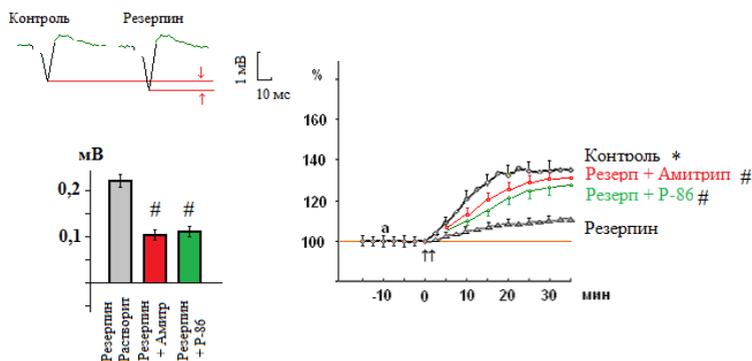


Рис. 3. Влияние хронического введения amitриптилина и соединения R-86 в дозах 20 и 10 мг/кг, соответственно, на функциональные нарушения релейных и пластических свойств синапсов пирамидных нейронов 2/3 слоев ППК при депрессивном поведении, вызываемом введением резерпина Справа – изменения амплитуд пВПСР пирамидных нейронов во времени, слева – сравнение амплитуды пВПСР пирамидных нейронов, а – исходная амплитуда. Отличия от исходного уровня (*) и повреждающего воздействия (#) достоверны при $p < 0,05$.

Таким образом, при действии на нейроны лимбических структур продуктов воспаления – интерлейкинов (ИЛ), простагландинов, активных форм кислорода и др. [Huang K. F. et al., 2010] изменяется обмен глутамата, что увеличивает уровень эксайтотоксичности. А также при ослаблении нейропротекторной активности моноаминов, особенно серотонина и дофамина [Martinowich K., 2008; Liu Y. et al., 2012], в связи с их дефицитом после введения резерпина в ключевой лимбической структуре ПФК развиваются функциональные повреждения пирамидных нейронов, проявляющиеся нарушением релейных и пластических свойств синапсов. Поскольку антидепрессанты имипрамин и amitриптилин, а также диакамф и соединении R-86, ослабляют указанные нарушения нейропластичности, причем наблюдается параллелизм во времени ослабления дефицита нейропластичности и уменьшения проявлений депрессивного фенотипа поведения, вполне допустимо, что нарушения нейропластичности пирамидных нейронов ПФК лежат в основе депрессивного поведения и эти нарушения имеют нейроатрофическую природу.

В главе пять описано, что диакамф и соединение R-86 способны ослабить вызываемые депрессогенными процедурами функциональные нарушения нейропластичности в пирамидных нейронах, по крайней мере в ПФК, возникает вполне обоснованный вопрос: могут ли эти вещества уменьшить или устранить хотя бы некоторые эндофенотипы моделируемой поведенческой депрессии? Нас интересовали два основных эндофенотипа депрессии – поведение отчаяния, нарушение реакции вознаграждения (ангедония). Их можно проанализировать на модели вызываемого хроническим плавательным стрессом депрессивного фенотипа поведения. Эта модель используется в ряде лабораторий [Gal Richter–Levin et al., 2018; Stone E. A. et al., 2011; Sun P. et al., 2011; Serchov T. et al., 2015]. Достоинствами этой модели поведения являются техническая простота, высокая степень воспроизводимости результатов, сохранение в течение минимум 4 недель депрессивного фенотипа поведения.

Через 20 дней после прекращения стрессогенного воздействия выявлены изменения поведения крыс. Они проявлялись увеличением времени иммобилизации в тесте вынужденного плавания от $45,5 \pm 2,3$ с до $70,2 \pm 3,6$ с и уменьшением показателя предпочтения потребления сахарозы от $83,6 \pm 3,4\%$ до $65,4 \pm 5,5\%$ у крыс которым вводили растворитель (рис. 4).

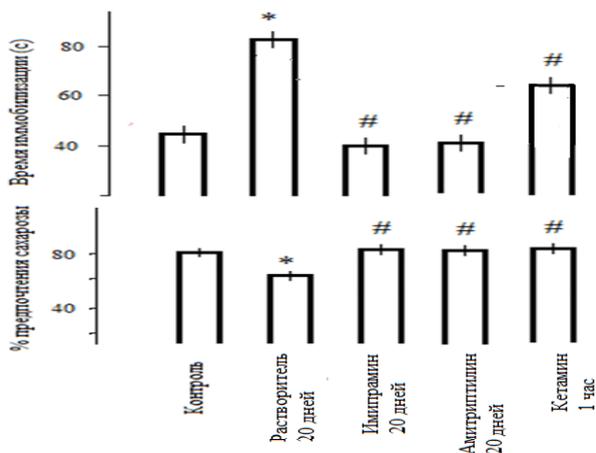


Рис. 4. Влияние хронического введения трициклических антидепрессантов и однократного введения кетамина на изменение времени иммобилизации и показатель предпочтения раствора сахарозы при вызванных плавательным стрессом нарушениях поведения у крыс. Изменения достоверны относительно интактной группы (*) и групп с повреждающим воздействием (#) при $p < 0,05$.

У крыс же, которым на протяжении 20 дней вводили имипрамин и amitriptyline в дозе 20 мг/кг, эти показатели практически не отличались

от исходных – $40,2 \pm 1,8$ с и $44,6 \pm 3,1$ с, $85,5 \pm 3,4\%$ и $83,2 \pm 3,7\%$ соответственно (рис. 4). Однократное введение кетамина в дозе 5 мг/кг через 1 час после введения вызывало подобные традиционным антидепрессантам изменения поведения крыс (рис. 4). Поскольку воздействие хронического неизбежного плавательного стресса увеличивает время иммобилизации, но уменьшает предпочтение потребления сладкого раствора, и эти изменения ослабляются антидепрессантами, их можно оценить как проявления депрессивного поведения.

После 20 дней хронического введения диакамф уменьшал время иммобилизации от $70,2 \pm 3,6$ с до $41,6 \pm 3,9$ с и увеличивал показатель предпочтения потребления раствора сахарозы от $65,4 \pm 5,5\%$ до $84,5 \pm 4,2\%$ (рис. 5). Соединение R-86 также уменьшало время иммобилизации крыс до $50,6 \pm 3,3$ с против $83,4 \pm 3,0$ с, а показатель предпочтения потребления раствора сахарозы увеличивал до $76,7 \pm 2,9\%$ против $66,7 \pm 2,1\%$ (рис. 5). Подобным действием обладал позитивный референтный препарат пираретам. Однако негативный референтный препарат дексаметазон при субхроническом введении, напротив, усиливал вызываемые неизбежным плавательным стрессом нарушения поведения. Действительно, время иммобилизации крыс возрастало до $105,9 \pm 4,8$ с против $83,4 \pm 3,0$ с, а показатель предпочтения потребления сладкого раствора снижался до $46,5 \pm 2,4\%$ против $66,7 \pm 2,1\%$ (рис. 5).

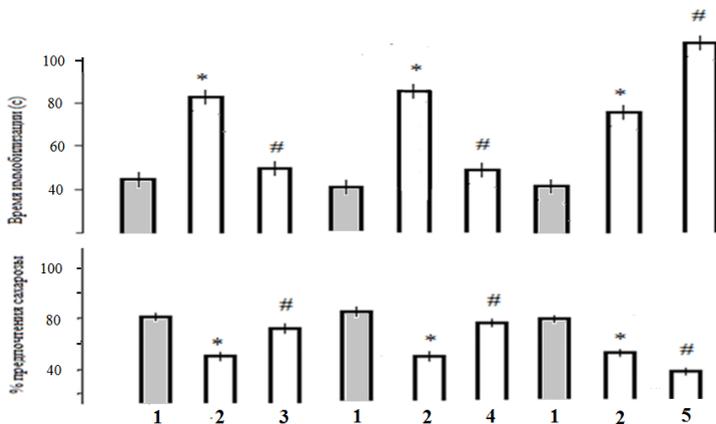


Рис. 5. Влияние хронического на протяжении 20 дней введения диакамфа и соединения R-86 в дозе 10 мг/кг и субхронического введения дексаметазона в дозе 0,5 мг/кг на вызываемые плавательным стрессом изменения поведения крыс. 1 – исходный показатель; 2 – его изменения у крыс, которым вводили растворитель; 3 – диакамф 10 мг/кг; 4 – соединение R-86 10 мг/кг; 5 – дексаметазон 0,5 мг/кг.

Таким образом, исследуемые вещества с церебропротективной активностью диакамф и соединение R-86, а также позитивный

референтный препарат пираретам улучшают функциональное состояние мозга, обнаруживают антидепрессивное действие, ослабляя два важнейших симптома вызванного неизбежным плавательным стрессом депрессивного фенотипа поведения: угнетение мотиваций избавления от угрожающей ситуации и нарушение реакций вознаграждения. Негативный референтный препарат дексаметазон, повреждает нейроны и усиливает действие других повреждающих нейроны процедур, ухудшает проявления вызванной стрессом поведенческой депрессии. Однако в отличие от традиционных антидепрессантов, которые при однократном или хроническом введении интактным животным уменьшают время иммобилизации в тесте вынужденного плавания [Машковский М.Д., и др., 1983], церебропротекторы не оказывают влияния на этот показатель у интактных животных, но действуют только при хроническом введении животным с депрессивным фенотипом поведения.

Одним из направлений лечения резистентных к фармакотерапии форм депрессии является усиление (аугментация) действия антидепрессантов, т.е. сочетание антидепрессантов с лекарственными препаратами, не относящимися к антидепрессантам. Поэтому далее мы попытались выяснить влияние исследуемых веществ, которые улучшают функциональное состояние мозга, на поведение животных и антидепрессивную активность имиπραмина и amitриптилина в условиях моделирования депрессивного фенотипа поведения, вызываемого хроническим плавательным стрессом.

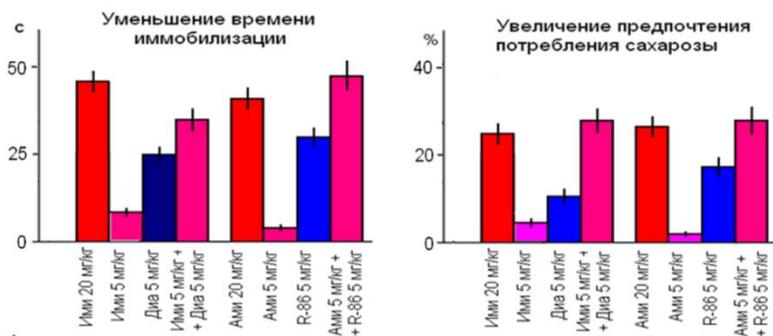


Рис. 6. Влияние совместного хронического введения неэффективных доз имиπραмина (Ими) или amitриптилина (Ами) (5 мг/кг) + ½ эффективных доз (5 мг/кг) церебропротекторов диакамафа (Диа) или соединения R-86 на нарушенные неизбежным плавательным стрессом показатели поведения крыс. По вертикальной шкале слева – уменьшение времени иммобилизации в с, справа – увеличение показатель предпочтения потребления сахарозы в %.

Хроническое введение имиπραмина и amitриптилина в эффективных дозах 20 мг/кг крысам, подвергнутым воздействию хронического

плавательного стресса, вызывало достоверное снижение времени иммобилизации животных, но и увеличение показателя предпочтения потребления раствора сахарозы. Введение же антидепрессантов в дозах 5 мг/кг (1/4 от предыдущих доз) крысам в тех же условиях не вызывало достоверных изменений исследуемых показателей (рис. 6). В тоже время, совместное введение дробных доз – ¼ дозы имипрамина + ½ дозы диакамфа или ¼ дозы амитриптилина + ½ дозы соединения R-86 вызывало такой же или даже больший поведенческий эффект по сравнению с полной (20 мг/кг) дозой антидепрессантов (рис. 6). Это в соответствии с законами общей фармакологии указывает на потенцированный синергизм [Харкевич Д. А., 2018]. Также диакамф и соединение R-86 усиливали поведенческие эффекты быстродействующего антидепрессанта кетамина при вызванной неизбежным плавательным стрессом поведенческой депрессии.

В главе 6 показано, что хроническое воспаление вызывает функциональные и морфологические изменения деятельности нейронов лимбических структур мозга, из-за образования и высвобождения провоспалительных цитокинов – ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО, простагландинов в крови и головном мозге. Вызываемое цитокинами нарушение обмена триптофана в мозге приводит к образованию агонистов глутаматных НМДА рецепторов и активных форм кислорода, которые далее обуславливают эксайтотоксические и оксидативные повреждения нейронов [He P. et al., 2012; Huang K. F. et al., 2010; Wang D. S. et al., 2012]. На синаптическом уровне, возможно, как усиление пресинаптического высвобождения глутамата, так и увеличение плотности постсинаптических глутаматных рецепторов [Frankland P.W. et al., 2005]. Также воспалительные реакции активируют экспрессию фермента индол-2,3-диоксигеназа (ИДО), во внутренних органах, в том числе в головном мозге. ИДО шунтирует путь превращения триптофана в серотонин, способствуя конвертации триптофана в кинуренин, который обладает выраженным продепрессивным действием [Шилов Ю.Е. и др., 2013]. Все эти изменения приводят к развитию депрессивного фенотипа поведения. Этим и определялся выбор другой модели депрессии – вызванной хроническим воспалением мягких тканей спины у крыс.

На 20-й день после введения уксусной кислоты у крыс наблюдали выраженный депрессивный фенотип поведения: увеличение времени иммобилизации в тесте Порсолта до $117,4 \pm 6,2$ с против $59,4 \pm 3,4$ с у интактных животных, и уменьшение показателя предпочтения потребления раствора сахарозы от $81,9 \pm 1,9\%$ в контроле до $61,2 \pm 2,7\%$ (рис. 7). При хроническом введении имипрамина и амитриптилина увеличенное хроническим воспалением время иммобилизации крыс снижалось до $45,0 \pm 1,3$ с и $47,2 \pm 2,3$ с, а показатели предпочтения потребления сладкого раствора возрастали до $84,2 \pm 4,1\%$ и $85,5 \pm 3,4\%$ соответственно (рис. 7).

Через 1 час после однократного введения кетамина в дозе 0,5 мг/кг время иммобилизации уменьшалось до $63,3 \pm 5,2$ с, а характеризующий ангедонию показатель возрастал до $64,8 \pm 2,3\%$ против $51,7 \pm 2,4\%$ у получавших растворитель крыс (рис. 7).

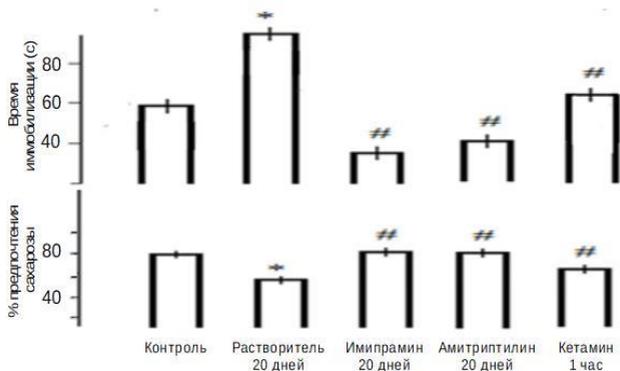


Рис. 7. Влияние хронического введения трициклических антидепрессантов и однократного введения кетамина на изменения времени иммобилизации и показатель предпочтения раствора сахарозы при вызванных хроническим воспалением нарушениях поведения у крыс. Изменения достоверны относительно интактной группы (*) и групп с повреждающим воздействием (#) при $p < 0,05$.

Таким образом, все исследуемые антидепрессанты, обладающие разными функциональными особенностями, обращали вызываемое хроническим воспалением нарушения поведения у крыс. Это позволяет сделать заключение, что наблюдаемые изменения поведения крыс являются проявлением депрессивного фенотипа поведения.

На фоне депрессивного фенотипа поведения, вызванного у крыс хроническим воспалением диакамф после 20 дней введения уменьшал время иммобилизации от $117,4 \pm 6,2$ с до $48,2 \pm 3,6$ с и увеличивал показатель предпочтения потребления раствора сахарозы от $61,2 \pm 2,7\%$ до $81,8 \pm 4,2\%$ (табл. 1). Другой препарат R-86 также уменьшал время иммобилизации крыс до $55,2 \pm 3,6$ с, а показатель предпочтения потребления раствора сахарозы увеличивал до $78,9 \pm 3,4\%$. Подобным действием обладал позитивный референтный препарат пирацетам (табл. 1). Таким образом, результаты исследования однозначно указывают на то, что препараты с установленной церебропротективной активностью диакамф, соединение R-86 и клинически используемый пирацетам в условиях хронического введения ослабляют проявления поведенческой депрессии, вызываемой хроническим воспалением, т. е. проявляют антидепрессивное действие, хотя по скорости развития и величинам эффекта уступают традиционным антидепрессантам.

Таблица 1. Влияние исследуемых веществ с церебропротективной активностью на нарушенные хроническим воспалением параметры поведения крыс при введении в течение 20 дней.

Параметры	Введение растворителя	Введение диакамфа 10 мг/кг	Введение R-86 10 мг/кг	Введение пирацетама 100 мг/кг
Продолжительность иммобилизации (с)	117,4 ± 6,2	48,2 ± 3,6#	55,2 ± 3,6#	43,0 ± 4,0#
% предпочтения раствора сахарозы	61,2 ± 2,7	80,2 ± 3,1#	78,9 ± 3,4#	81,8 ± 4,2#

– величины достоверно отличаются от повреждающего воздействия при $p < 0,05$.

Хроническое введение имипрамина в дозе 20 мг/кг достоверно уменьшало время иммобилизации крыс от 117,4 ± 6,2 с до 45,2 ± 1,8 с; в меньшей дозе 5 мг/кг имипрамин не вызывал достоверных изменений этого показателя – 98,6 ± 7,2 с (рис. 8). Другой трициклический антидепрессант амитриптилин в этих же дозах вызывал сходные с имипрамином эффекты, изменяя время иммобилизации до 47,2 ± 2,5 и 108,2 ± 5,3 с в дозах 20 и 5 мг/кг соответственно (рис. 8).

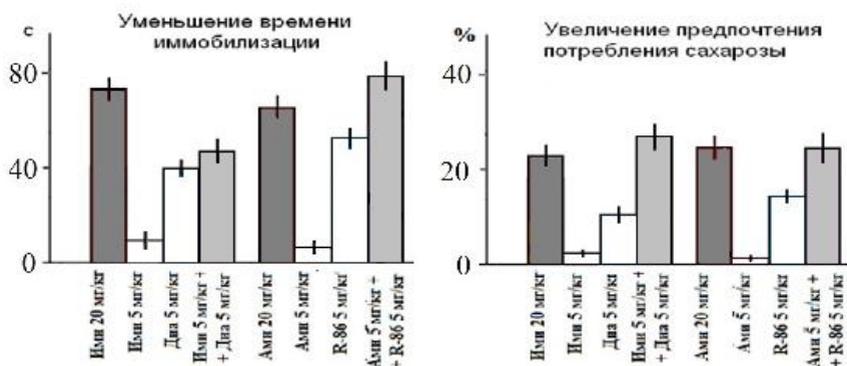


Рис. 8. Влияние совместного хронического введения неэффективных доз имипрамина (Ими) или амитриптилина (Ами) (5 мг/кг) + ½ эффективных доз церебропротекторов диакамфа (Диа) или соединения R-86 на нарушенные хроническим воспалением показатели поведения крыс. По вертикальной шкале слева – уменьшение времени иммобилизации в с, справа – показатель увеличения предпочтения потребления сахарозы в %.

При совместном хроническом введении 1/4 дозы имипрамина (5 мг/кг) и 1/2 дозы диакамфа (5 мг/кг) наблюдали эффект меньший, нежели эффект от полной (20 мг/кг) дозы имипрамина по их влиянию на время иммобилизации, но эффект равнялся сумме эффектов обоих веществ (рис. 8). Т. е. в этом случае имел место аддитивный синергизм. При совместном

хроническом введении 1/4 дозы амитриптилина (5 мг/кг) и 1/2 дозы соединения R-86 (5 мг/кг) наблюдали уменьшение времени иммобилизации крыс даже в большей степени, нежели от полной (20 мг/кг) дозы амитриптилина (рис. 8), что указывает на потенцированный синергизм. При совместном хроническом введении 1/4 дозы имипрамина и 1/2 дозы диакамфа, а также 1/4 дозы амитриптилина и 1/2 дозы соединения R-86 наблюдали такое же увеличение показателя предпочтения сахарозы, как и от полных (20 мг/кг) доз антидепрессантов (рис. 8). Препарат сравнения пирацетам подобно соединению R-86 потенцировал влияние имипрамина на время иммобилизации и предпочтение потребления сахарозы. Все исследуемые вещества с церебропротективной активностью потенцировали поведенческие эффекты однократно вводимого антидепрессанта кетамина. Таким образом, вещества с церебропротективной активностью потенцируют антидепрессивное действие имипрамина, амитриптилина и кетамина при вызванной хроническим воспалением поведенческой депрессии у крыс.

В данной работе исследовались эффекты изучаемых веществ на клеточном (нейрональном) и системном (поведенческом) уровнях. С помощью анализа коэффициентов корреляции рангов по Спирмену выясняли вероятную функциональную связь между нейропротективной и антидепрессивной активностью изучаемых веществ. Как следует из табл. 2 вызываемое исследуемыми веществами уменьшение времени иммобилизации крыс в тесте вынужденного плавания (ослабление угнетения мотивации избавления от угрожающей ситуации) при вызванной неизбежным плавательным стрессом, но не хроническим воспалением поведенческой депрессии обнаруживает достоверную корреляционную связь (0,943; $p < 0,05$) с их антиэксайтотоксическим действием.

Столь же тесная корреляционная связь выявлена между способностью исследуемых веществ ослаблять повреждение нейронов, вызываемое оксидативным стрессом, и уменьшением времени иммобилизации крыс и проявлений ангедонии при обеих формах поведенческой депрессии (табл. 2). В тоже время, достоверная корреляционная связь между антианоксическим действием и способностью исследуемых веществ уменьшать время иммобилизации крыс и увеличивать показатель предпочтения потребления сладкого раствора отсутствует (табл. 2).

Следовательно, присущая исследуемым веществам способность ослаблять вызываемые оксидативным стрессом повреждения нейронов и в меньшей степени их антиэксайтотоксическая активность определяют их корректирующее влияние на проявления депрессивного фенотипа поведения – угнетение мотиваций избавления от угрожающей ситуации и нарушения реакций вознаграждения.

Таблица 2. Матрица коэффициентов корреляции рангов по Спирмену между церебропротективной и антидепрессивной активностью исследуемых веществ при поведенческой депрессии, вызванной плавательным стрессом (верхние цифры в каждой ячейке) и хроническим воспалением (нижние цифры в каждой ячейке).

Проявления поведенческой активности	Проявления церебропротективной активности		
	Ослабление эксайтотоксичности	Ослабление оксидативного стресса	Ослабление аноксических повреждений
Уменьшение времени иммобилизации	0,943* 0,829	0,943* 0,943*	-0,657 -0,829
Увеличение показателя предпочтения раствора сахарозы	0,643 0,714	0,943* 0,943*	-0,820 -0,620

Для данной выборки достоверный на уровне 0,05 коэффициент корреляции рангов равен 0,850.

Полученные нами данные о том, что уменьшающие повреждение мозга церебропротекторы подобно антидепрессантам могут ослаблять некоторые проявления депрессии, подтверждают правоту и расширяют рамки нейропластической гипотезы патогенеза депрессии. В тоже время очевидно, что церебропротекторы не равноценны и не могут заменить антидепрессанты. Действие антидепрессантов избирательно в отношении лимбических структур, контролирующих когнитивные, эмоциональные процессы и настроение, в то время как действие церебропротекторов не избирательно и направлено на все структуры мозга. Поэтому вероятное место церебропротекторов в лечении депрессивных расстройств – дополнение и усиление действия антидепрессантов.

Выводы

1. При хроническом введении крысам диакамф, соединение R-86 и препарат сравнения пираретам обладают церебропротективной активностью, которая проявляется ослаблением повреждения пирамидных нейронов гиппокампа эксайтотоксическим действием в 1,15–1,40 раза, оксидативным стрессом в 1,87–3,00 раза и процедурой аноксии/агликемии в 2,14–3,09 раза. Негативный референтный препарат дексаметазон усиливал повреждения нейронов используемыми воздействиями.

2. Диакамфом, соединением R-86, amitriptилином и имипрамином, хронически вводимыми, существенно ослаблялись нарушения функциональной активности выявленных изменений пирамидных нейронов II/III и V слоев прелимбической и передней поясной коры – разнонаправленные изменения релейных и угнетение пластических свойств их синапсов при поведенческой депрессии, вызванной хроническим воспалением и введением резерпина.

3. При хроническом введении диакамф и соединение R-86 демонстрировали антидепрессивное действие, которое было слабее по сравнению с действием антидепрессантов. Так, после 20 дней введения диакамф в 2,56 раза, соединение R-86 в 1,65 раза, а имипрамин и амитриптилин в 2,86 и 2,68 раза ослабляли нарушения мотивации избавления, вызываемые стрессом; эти же нарушения, вызываемые воспалением уменьшались диакамфом в 2,43 раза, соединением R-86 в 2,12 раза, имипрамином и амитриптилином в 4,70 и 3,85 раз. Все исследуемые вещества почти в одинаковой степени ~ в 1,3 раза уменьшали ангедонию при обеих формах поведенческой депрессии.

4. При совместном использовании дробных доз церебропротекторов и антидепрессантов наблюдали разные проявления синергизма. Так при хроническом введении диакамфа и имипрамина наблюдали аддитивный синергизм, кроме их влияния на ангедонию, вызываемую хроническим воспалением. Но диакамф усиливал антидепрессивное действие кетамина.

5. Соединение R-86 и препарат сравнения пираретам потенцировали антидепрессивное действие имипрамина, амитриптилина и кетамина при обеих формах поведенческой депрессии у крыс.

6. Для диакамфа, соединения R-86 и других используемых препаратов выявлена достоверная функциональная связь (коэффициенты корреляции рангов 0,829–0,943) между такими проявлениями церебропротективной активности, как антиэксцитотоксическое и антиоксидантное действие и их антидепрессивной активностью. Антианоксическое действие церебропротекторов не играет существенной роли в их антидепрессивном действии.

Научно–практические рекомендации

1. Созданный на основе диакамфа лекарственный препарат может быть рекомендован для систематического введения пациентам в период между обострениями депрессии для пролонгирования ремиссии, поскольку эти вещества предотвращают морфофункциональные нарушения нейронов и усиливают репаративные процессы в поврежденных болезнью нейронных сетях.

2. Разработанное на основе соединения R-86 лекарство и референтный препарат пираретам, могут быть использованы совместно с антидепрессантами для лечения больных в период обострения депрессии для усиления действия традиционных антидепрессантов при лечении чувствительных и резистентных к фармакотерапии формах заболевания.

Список работ, опубликованных по теме диссертации, в том числе статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Antidepressant-like effects of substances with cerebroprotective activity / **Tamara O. Zayka**, Dmitry V. Evdokimov, Yulia V. Sidorova, Igor I.

Abramets, Sergey V. Nalotov.// Biological markers and guided therapy. – 2015. – Vol. 2, (1). – P. 79–88.

2. Особенности нейрохимических механизмов нейропротекторного действия диакамфа гидрохлорида / Евдокимов Д. В., **Зайка Т. О.** // Материалы 77-го медицинского конгресса молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины», посвященного 85-летию ДонНМУ им. М. Горького, г. Донецк. – 2015. – С. 130.

3. Изменения нейрофизиологических параметров передней поясной коры крыс при экспериментальном депрессивном синдроме различного генеза / Абрамец И. И., Евдокимов Д. В., **Зайка Т. О.** // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2016. – Т. 24, №2. – С. 21–30.

4. Изменение пластических и релейных свойств глутаматергических синапсов в прелимбической коре крыс при поведенческой депрессии / Абрамец И. И., Евдокимов Д. В., **Зайка Т. О.** // Журнал Биомедицина. – 2016. – № 2. – С. 22–31.

5. Церебропротективное и антидепрессантоподобное действие производного оксиндола (соединение R-86) при вызванной плавательным стрессом поведенческой депрессии / **Зайка Т. О.**, Абрамец И. И., Евдокимов Д. В. // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2017. – №3. – С. 45–51.

6. Выявление антидепрессантной активности у пираретама и диакамфа / **Зайка Т. О.**, Селезнев Е. А, Сапьянная М. В. // Материалы 79-го медицинского конгресса молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины», г. Донецк. – 2017. – С. 502.

7. Антидепрессантоподобное действие диакамфа при стресс-индуцируемой поведенческой депрессии / **Зайка Т. О.**, Евдокимов Д. В., Абрамец И. И. // Российский медико-биологический вестник им. Академика И.П. Павлова. – 2018. – Т. 26, № 3. – С. 351–359.

8. Проявление антидепрессантоподобного действия у диакамфа при моделировании поведенческой депрессии / Бельских Е. Н., Селезнев Е. А., **Зайка Т. О.** // Материалы 80-го медицинского конгресса молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины», г. Донецк. – 2018. – С. 523–524.

9. Выявление антидепрессантных свойств у препарата R-86 / **Зайка Т. О.**, Селезнев Е. А., Бельских Е. Н. // Материалы 80-го медицинского конгресса молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины», г. Донецк. – 2018. – С. 525–526.

10. Экспериментальные исследования взаимодействий веществ с церебропротективной активностью с имипрамином / **Зайка Т. О.**, Евдокимов Д. В., Абрамец И. И. // Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2018. – Т. 7, №3. – С. 18–23.

11. Studies of the effect of cerebroprotective substances on the course of stress-induced behavioral depression / **Tamara O. Zayka**, Dmitriy V. Evdokimov, Igor I. Abramets // Research Results in Pharmacology. 2018. – Vol.4(3). – P. 43–48. DOI 10.3897/rpharmacology.4.29946.

12. Исследования церебропротективной активности производных имидазола и индола и их влияния на эффекты антидепрессантов / Абрамец И. И., **Зайка Т. О.**, Евдокимов Д. В., Кузнецов Ю. В., Сидорова Ю. В. // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2020. – № 1. – С. 11–17.

Перечень используемых сокращений

BDNF – нейротрофный фактор мозга;

CA1, 3 – отдел гиппокампа (Cogni Ammonu);

в/б – внутривенное введение;

ДП – длительная потенциация синаптической передачи;

ДГ – дорсальный гиппокамп;

ИЛ – интерлейкин;

мМ, мкМ – миллимоль, микромоль;

мПФК – медиальная префронтальная кора;

пВПСП – популяционный возбуждающий постсинаптический потенциал;

ПЛК – прелимбическая кора;

ППК – передняя поясная кора;

СИОЗ – селективные ингибиторы обратного захвата;

ФНО – фактор некроза опухоли;

Зайка Тамара Олеговна

Экспериментальные исследования церебропротективной активности и ее связи с антидепрессивным действием фармакологических веществ производных бензимидазола и оксиндола

14.03.06 Фармакология и клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать __. __. 202_ г.
Формат 60x84/16. Печать офсетная. Усл.–печ. л. __.
Усл. изд.л. __ Тираж 100 экз. Заказ __
Отпечатано в типографии