

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ МИНЗДРАВА РОССИИ

На правах рукописи

ФИЛИНА ИНГА СЕРГЕЕВНА

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

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

ВОЛГОГРАД - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы. Иммунологические аспекты ишемии головного мозга.	14
1.1. Молекулярные процессы, связанные с повреждением нервной ткани. ...	15
1.2. Пути реализации иммунного ответа при ишемическом поражении нервной ткани.	21
1.2.1. Активация опосредованного иммунными клетками восстановления нервной ткани.	24
1.3. Особенности нейроиммунной дисфункции при нарушениях мозгового кровообращения.	28
1.4. Регуляция иммунного ответа при патологии нервной системы.	29
1.4.1. Взаимодействие головного мозга и иммунной системы после инсульта.	31
1.5. Перспективы применения фенильных производных ГАМК и глутаминовой кислоты в терапии ишемического инсульта.	32
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования.	36
2.1. Материалы исследования.	36
2.2. Методы исследования.	39
2.2.1. Методы изучения влияния исследуемых веществ на иммунную систему и общую реактивность организма.	39
2.2.2. Модели изменения иммунореактивности.....	45
2.2.3. Методы оценки двигательной активности, координации движений и мышечной силы у животных.	46
2.2.4. Метод моделирование церебральной ишемии.	49
2.2.5. Метод оценки неврологического статуса.	50
2.2.6. Метод регистрации уровня локального мозгового кровотока.	51
2.2.7. Метод определения постишемического отека мозговой ткани.	51
2.2.8. Метод иммуноферментного анализа.....	51

2.3. Дизайн исследования.	52
ГЛАВА 3. Иммуотропная и психотропная активность производных ГАМК и глутаминовой кислоты.	55
3.1. Иммуотропная активность производных ГАМК и глутаминовой кислоты.	55
3.1.1. Влияния исследуемых веществ на гуморальный иммунный ответ при однократном и курсовом двухнедельном введении.	56
3.1.2. Влияния исследуемых веществ на клеточный иммунный ответ при однократном и курсовом двухнедельном введении.	58
3.1.3. Влияния исследуемых веществ на фагоцитоз при курсовом двухнедельном введении.	60
3.2. Психотропная активность производных ГАМК и глутаминовой кислоты при курсовом двухнедельном их применении в условиях развития иммунного ответа на антиген.	61
ГЛАВА 4. Церебропротекторное действие фенибута, нейроглутама и церебролизина при ишемии головного мозга в условиях измененной иммунореактивности животных.	70
4.1. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на летальность животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.	71
4.2. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на неврологический дефицит у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.	73
4.3. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на координацию движений, мышечную силу и поведение животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.	75
4.4. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на уровень мозгового кровотока и процент гидратации ткани головного мозга после необратимой окклюзии общих сонных артерий.	79
4.5. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на содержание нейронспецифических белков и нейротрофинов в сыворотке крови у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.	82

4.5.1.Содержание нейронспецифических белков: нейронспецифической енолазы – NSE и основного белка миелина – MBP.....	83
4.5.2.Содержание нейротрофинов: фактора роста нервов – NGF и нейротрофического фактора головного мозга – BDNF.	90
ГЛАВА 5. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на состояние иммунной системы животных при ишемическом поражении головного мозга в условиях измененной иммунореактивности.....	97
5.1. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на массу тимуса и селезенки у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.	98
5.2. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на общее количество лейкоцитов и их субпопуляций в периферической крови у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.	105
5.3. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на уровни про- и противовоспалительных цитокинов - IL-1 β , IL-6 и IL-4 в сыворотке крови после необратимой окклюзии общих сонных артерий.	107
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	116
ВЫВОДЫ.....	130
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	133
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	134
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

В Российской Федерации, как и во всем мире, острые нарушения мозгового кровообращения являются одной из важнейших медико-социальных проблем, что обусловлено их высокой долей в структуре заболеваемости, а также большими показателями инвалидизации и смертности населения [15, 197]. В России частота инсультов составляет в среднем 350-400 случаев на 100 тыс. населения [15]. На долю ишемического инсульта в нашей стране, как и в большинстве стран мира, приходится около 80% всех случаев инсульта [29, 31].

В острой стадии инсульта смертность составляет около 35%, увеличиваясь еще на 15% к концу первого года [86]. Инвалидизация после перенесенного инсульта занимает первое место среди всех причин первичной инвалидности. Социально-экономическая значимость этого заболевания обусловлена также тем, что среди перенесших инсульт 1/3 – люди трудоспособного возраста, а к труду возвращается не более 20 % больных. Хотя наибольшая заболеваемость наблюдается у лиц в возрасте между 50 и 70 годами [15], наблюдается увеличение частоты инсульта в работоспособном возрасте [64].

Известно, что гибель нервной ткани и формирование инфаркта при остром нарушении мозгового кровообращения являются результатом каскада патобиохимических и патофизиологических процессов [33]. Патогенез мозговой ишемии включает большое количество факторов, таких как гипоксия, реперфузионные повреждения, а также реакции воспаления, которые, в свою очередь, имея динамический характер, сопровождаются вовлечением различных механизмов про- и противовоспалительного характера на разных стадиях ишемического каскада и играют неоднозначную роль [32].

Ишемический инсульт сопровождается нарушением нейроиммунного гомеостаза мозга, центральной регуляции функций иммунной системы [52,

155] и приводит к инициации воспалительных процессов как в центральной нервной системе, так и на периферии [170], к нарушениям в системном и региональном иммунном ответе, а в дальнейшем к развитию иммунодефицита [136], проявляющегося депрессией клеточного и неспецифического звена иммунитета [51, 53, 80, 85, 123, 161, 227].

В свою очередь, в ответ на повреждение нервной ткани происходит активация гуморального звена, что может привести к аутоиммунным осложнениям [53]. Неконтролируемая активизация воспалительных процессов во время острой гипоксии мозга способствует расширению площади его некроза [38]. Дисбаланс цитокинов в сторону увеличения провоспалительного потенциала и локальная воспалительная реакция в ответ на действие повреждающего фактора приводит к повреждению нейронов, гематоэнцефалического барьера и нарушениям микроциркуляции [92, 164].

По-видимому, иммунная система может выполнять двойственную роль в патогенезе острых нарушений мозгового кровообращения. В острой фазе активизируются иммунные механизмы, приводящие к иммунному воспалению, но в дальнейшем, как компенсаторный механизм, развивается иммуносупрессия. С одной стороны, иммуносупрессия может выполнять протекторную роль, ограничивая постишемическую активацию резидентных и привлекаемых из периферии провоспалительных клеток, таких как микроглия и Т-лимфоциты [170], а с другой стороны в результате снижения пролиферативной и функциональной активности клеток-эффекторов, иммуносупрессия в целом может приводить к увеличению восприимчивости организма больных к тяжелым инфекциям [85, 187, 197], торможению процессов репарации в стадии разрешения воспаления [131].

Степень разработанности проблемы.

За последние годы были проведены многочисленные исследования, посвященные изучению нейроиммунного взаимодействия при различных патологических состояниях [6, 12, 20, 41, 74, 75, 123, 170], в том числе и при сосудистых заболеваниях головного мозга [32, 39, 44, 65, 70, 71, 122], а также

путей их фармакологической коррекции [28, 52, 97, 149], в которых была показана значимая роль иммунной системы в течение и исходе данных патологий. В литературе имеется огромное количество экспериментальных и клинических данных, доказывающих изменение иммунного статуса организма, связанного с ишемическим инсультом [42, 53, 81, 85, 123, 131, 136, 153, 155, 161, 169, 178, 187, 227]. Однако вопрос о роли состояния иммунной системы в течении острых нарушений мозгового кровообращения и в обеспечении терапевтического действия применяемых лекарственных средств является малоизученным.

Цель исследования.

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

Задачи исследования.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить иммуотропные свойства производных ГАМК и глутаминовой кислоты при однократном и курсовом их применении, оценив влияние веществ на гуморальное и клеточное звено первичного иммунного ответа на антиген, а также на фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов.
2. Изучить психотропное действие производных ГАМК и глутаминовой кислоты в условиях развития первичного иммунного ответа на антиген при курсовом введении веществ.
3. Исследовать влияние подавленного и стимулированного иммунитета животных на течение и исход ишемического повреждения головного мозга у крыс после необратимой окклюзии сонных артерий.
4. Оценить влияние фенибута, нейроглутама и препарата сравнения церебролизина на течение и исход ишемии головного мозга в условиях

измененной иммунореактивности: гибель животных, степень выраженности неврологического дефицита, показатели сенсомоторной, двигательной и исследовательской активности.

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

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

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

Новизна исследования.

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

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

системы, церебролизин – при неизменном и подавленном иммунитете, а нейроглютам был эффективен независимо от иммунореактивности животных.

Научно-практическая ценность работы.

В ходе диссертационного исследования проведена сравнительная оценка церебропротекторного и иммунокорригирующего действия фенильных производных ГАМК и глутаминовой кислоты – фенибута и нейроглутама (соединения РГПУ-135), а также препарата сравнения церебролизина в условиях неизменной, подавленной и стимулированной иммунной системы животных. Полученные результаты по активности указанных веществ обосновывают целесообразность применения при острых нарушениях мозгового кровообращения средств, обладающих помимо нейропротекторного действия и иммунокорригирующими свойствами. Отмечена зависимость терапевтического эффекта исследуемых веществ от фонового состояния иммунной системы животных. Так, нейроглютам оказал выраженное нейропротекторное действие при инсульте независимо от иммунного статуса, терапевтический эффект при применении фенибута был более выражен при стимулированном иммунитете, а препарат церебролизин оказывал максимальный терапевтический эффект при неизменном и подавленном иммунитете. Таким образом, результаты представленного исследования указывают о влиянии состояния иммунной системы на течение и последствия острого нарушения мозгового кровообращения; на неоднозначность терапевтического действия исследуемых веществ в зависимости от состояния иммунитета. При поиске и разработке лекарственных средств, предназначенных для лечения острых нарушений мозгового кровообращения, необходимо учитывать коморбидный фон иммунной системы экспериментальных животных.

Реализация результатов.

Результаты проведенного исследования включены в материалы лекций и практических занятий для студентов на кафедре фармакологии ВолгГМУ, Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ и

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

Методология и методы исследования.

В исследовании использован комплексный подход к изучению нейропротекторного и иммунотропного влияния веществ на животных с ишемическим повреждением головного мозга, моделированным необратимой поэтапной перевязкой общих сонных артерий с 3-х суточным интервалом в условиях измененного состояния их иммунной системы. В качестве объектов исследования выступали крысы-самцы линии Wistar массой 210-250 г 5-6 мес. возраста. Изучение влияния фенильных производных ГАМК и глутаминовой кислоты, а также препарата сравнения церебролизина на нервную и иммунную системы животных, перенесших ишемическое поражение головного мозга в условиях измененной иммунореактивности проводилось с использованием методических рекомендаций по

доклиническому изучению лекарственных средств [61] и с применением рекомендованных методов статистической обработки данных [23, 72].

Положения, выносимые на защиту.

1. Фенильное производное ГАМК-фенибут и фенильное производное глутаминовой кислоты – нейроглютам (соединение РГПУ-135) обладают выраженными иммуотропными свойствами, влияя на показатели гуморального, клеточного звена иммунного ответа на антигенный стимул и фагоцитарные показатели полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови.

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

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

4. Фоновое состояние иммунной системы в значительной мере влияет на эффективность нейропротекторного действия исследуемых веществ. Так фенильное производное глутаминовой кислоты – нейроглютам при введении в течение 7-ми дней после окклюзии общих сонных артерий оказывает сопоставимое церебропротекторное действие в условиях ишемии головного мозга как при неизменном иммунитете животных, так и на фоне

измененной иммунореактивности. В то время как фенильное производное ГАМК – фенибут оказывает наибольший нейропротекторный эффект при ишемии головного мозга на фоне стимулированной иммунной системы и в меньшей степени – при иммуносупрессии. Препарат церебролизин оказался более эффективен в лечении инсульта в условиях неизменного и подавленного иммунитета животных.

6. Одним из возможных механизмов нейропротекторного действия фенибута, нейроглутама и церебролизина при ишемии головного мозга, являются их иммунокорректирующие свойства, которые проявляются во влиянии на уровень про – ($IL-1\beta$, $IL-6$) и противовоспалительных цитокинов ($IL-4$), массу тимуса и селезенки, общее количество лейкоцитов и их субпопуляций.

Личный вклад.

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

Степень достоверности и апробации результатов.

Достоверность результатов исследования подтверждается значительным объемом экспериментальных данных, применением современного, высокотехнологичного оборудования, адекватных общепринятых методов и критериев статистической обработки данных. Материалы работы докладывались и обсуждались на IV Всероссийском научно-практическом семинаре молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» (Волгоград, 2012); 71-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и

клинической медицины» (Волгоград, 2013); Объединенном иммунологическом форуме-2013 (Нижний Новгород, 2013); V Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2013» (Санкт-Петербург, 2013, диплом I степени); 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2015). По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации.

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА.

Результаты многочисленных исследований последнего столетия в области иммунологии, неврологии и патофизиологии разрушили границы между данными дисциплинами, доказали фенотипическое и функциональное сходство клеток иммунной и нервной систем, их интеграцию в единое целое [2], что определило развитие новых научных направлений – нейроиммунологии и иммунофизиологии. Предметом изучения данных направлений являются, «с одной стороны, механизмы экстраиммунной (нервной, эндокринной и т.д.) регуляции функций иммунной системы, с другой – роль иммунологических механизмов в реализации работы нервной системы» [46, 156] и патогенезе ее заболеваний.

Процесс воспаления является частью патогенеза многих заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) [155, 171, 184]. Нейродегенерация, инфекция, травма и ишемия стимулируют иммунологический ответ различной степени выраженности в головном мозге (ГМ). Процесс нейронального повреждения включает в себя различные внутриклеточные механизмы (изменение метаболизма и дегенерацию белков в поврежденных тканях, нарушение функции органелл, выброс внутриядерных молекул в цитоплазму клетки), которые приводят к активации микроглии и инфильтрации нервной ткани циркулирующими иммунными клетками [171]. Воспаление не основная причина ишемического повреждения ГМ, но в то же время значимая, так как при ишемическом инсульте характер развития и последствия данного поражения во многом зависят как от степени и объема повреждения нейронов, так и от инфильтрации иммунными клетками ишемизированной области [155, 184].

Воспаление ведет к отеку ГМ, который может привести к фатальному исходу у пациентов с ишемическим инсультом. Некротическое поражение ткани приводит к обильной выработке воспалительных медиаторов и активации молекул, ассоциированных с повреждением (damage-associated

molecular pattern molecules, DAMP молекул), что усиливает хемотаксис циркулирующих иммунных клеток и делают их активными участниками воспалительного процесса [155, 184]. Церебральное воспаление напрямую затрагивает функциональную единицу «нейрон-капилляр-глия», усиливает сосудистую и эндотелиальную дисфункцию, вследствие чего объем повреждения нервной ткани увеличивается [135]. Таким образом, постишемическое воспаление является важной частью патофизиологии ишемического инсульта [135, 155, 171, 184]. Следует отметить, что посредством процесса воспаления элиминируются омертвевшие клетки и инородные вещества, накопленные в зоне некроза [155, 184]. Таким образом, воспаление, разрешение воспаления и восстановление последствий повреждения нервной ткани являются центральными процессами, происходящими последовательно после инсульта. Для того чтобы разработать новые более эффективные способы терапии ишемических нарушений ЦНС, необходимо принимать во внимание эти факты и продолжать изучение процесса церебрального воспаления, возникшего в результате острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК).

1.1. Молекулярные процессы, связанные с повреждением нервной ткани.

Ишемия головного мозга активирует различные метаболические изменения в клетках ГМ. Глубокая гипоксия, недостаток питательных веществ и стресс эндоплазматического ретикулума приводят к клеточной смерти и запускают процесс постишемического воспаления. Несмотря на то, что рецепторы к патогенам, такие как Толл-подобные рецепторы (TLR) (класс клеточных рецепторов, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ), считаются участниками ранней фазы воспаления, ГМ можно назвать стерильной средой, так как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) надежно защищает этот орган от проникновения любых инфекций извне. Вследствие этого эндогенные молекулы, такие как молекулы, ассоциированные с нарушением целостности ткани (DAMP молекулы), вырабатываемые

поврежденными клетками ГМ, запускают воспалительный процесс. DAMP молекулы активируют TLR и другие рецепторы, такие как, рецепторы к гликированным эндопродуктам, которые запускают экспрессию воспалительных медиаторов и процесс повреждения ткани (Таблица 1) [217, 219]. Последние научные исследования предполагают участие различных типов DAMP молекул в ишемическом поражении головного мозга.

Таблица 1

Воспалительные молекулы, связанные с нарушением целостности ткани (DAMP-молекулы)

	DAMP	Рецептор	Ссылка
Нуклеиновая кислота	Митохондриальная ДНК	TLR9	Zhang (2010), Sun (2013), Maeda (2014), Walko (2014), Wenceslau (2014)
	ДНК и РНК некротизированной клетки	TLR7,9	Hyakkoku (2010), Kawai (2010), Brea (2011), Stevens (2011), Leung (2012)
Липиды	Карбоксиалкилпирролы	TLR2	West (2010)
	Окисленные фосфолипиды	CD36	Haider (2011), Miller (2011), Ho (2012), Matt (2013)
Белки	HMGB1	TLR2,4, RAGE	Qiu (2008), Zhang (2011)
	Пероксиредоксин	TLR2,4	Shichita (2012), Kuang (2014)
	S100A8, A9	TLR4	Tsai (2014)
	Mrp8, 14	TLR4	Loser (2010)
	CIRP	TLR2,4	Qiang (2013)
Нуклеотиды	АТФ	P2X, P2Y	Martinon (2002), Ceruti (2009), Denes (2013), Fann (2013), Yang (2014)
Липиды	Фосфолипиды	?	Muralikrishna Adibhatla (2006), Shanta (2012), Iyer (2013)
Белки	Молекулы ASC	?	Baroja-Mazo (2014), Franklin (2014)

Роль нуклеиновых кислот и нуклеотидов в молекулярных процессах, связанных с повреждением нервной ткани. Одним из внутриклеточных компонентов, высвобождаемых во внеклеточное пространство в ходе гибели

нервных клеток ГМ, является митохондриальная ДНК, которая играет важную роль в реакциях обусловленных врожденным иммунитетом посредством активации TLR-9 и может быть обнаружена в цереброспинальной жидкости после травматического повреждения головного мозга [228, 238]. Существуют данные, что циркулирующие после повреждения в системном кровотоке митохондриальные DAMP молекулы повышают проницаемость сосудов [216, 233] и могут запускать процесс постишемического воспаления [174].

Молекулы ДНК и РНК высвобождаемые клеткой в ходе некротического поражения активируют иммунные клетки через TLR-7 или TLR-9 [159], это может способствовать удалению продуктов дегенерации и дальнейшему процессу регенерации. Недостаточную экспрессию TLR-7 связывают с развитием осложнений у пациентов с ишемическим инсультом. У мышей с недостатком TLR-9 повреждения ГМ не восстанавливаются, что может указывать на важную роль этого рецептора в процессе регенерации [116, 154]. Некоторые данные показывают, что модуляция TLR-7 и TLR-9 может изменить исход ишемического явления. Например, назначение агонистов TLR-7 и TLR-9 оказывает значительное нейропротективное действие на исход церебральной ишемии [167, 214]. Хотя механизм взаимодействия собственных нуклеиновых кислот и TLR в ходе ишемии головного мозга (ИГМ) до сих пор до конца не исследован, модуляция сигнальных путей активируемых TLR-7 и TLR-9 может стать одним из путей фармакологической коррекции необратимых последствий ИГМ.

Пурины (а именно АТФ (аденозинтрифосфат) и УТФ (уридинтрифосфат)), которые высвобождаются поврежденными клетками мозга и пуринергическими рецепторами (P2X и P2Y) выступают в роли сигнальных молекул в ЦНС [121]. Важно учитывать, что АТФ активирует так называемые инфламмосомы (особые белковые комплексы в макрофагах и нейтрофилах, которые приводят к запуску воспалительной реакции при контакте клетки с микроорганизмами, играют важную роль в системе

врождённого иммунитета), являющиеся крупными мультимолекулярными комплексами, которые контролируют активность протеолитического белка каспазы-1, переводящего про-IL-1 β в активную форму [175]. Активация инфламмасом типа NLRP1 и NLRP3 стимулирует постишемическое воспаление и разрушение нервных клеток [139, 236]. Поскольку IL-1 β , вырабатываемый как инфильтрирующими ткань иммунными клетками, так и клетками головного мозга, играет важную роль в этом нейровоспалительном процессе [132], необходимо исследовать, как инфламмасы активируются в ГМ при ишемии. Ингибирование активации инфламмасом может стать одним из потенциальных путей терапии ишемического инсульта.

Роль липидов в молекулярных процессах, связанных с повреждением нервной ткани. Различные типы липидов также являются важными регуляторами врожденного иммунитета, конечные продукты их окисления могут быть задействованы в процессе постишемического воспаления ГМ [223]. Карбоксиалкилпирролы, генерируемые в воспаленной ткани, активируют TLR-2 и стимулируют ангиогенез в ткани, подвергшейся ишемии [234]. Метаболизм фосфолипидов значительно изменяется в условиях церебральной ишемии [205]. Окисленные фосфолипиды, которые также относятся к DAMP молекулам [148, 151], являются лигандами CD36 рецепторов, которые, напротив, стимулируют воспалительные процессы путем активации TLR-2 в головном мозге, подверженном ишемии [176, 180]. Таким образом, в результате активации TLR-2 может происходить либо стимуляция регенерации поврежденной ткани посредством реваскуляризации вследствие ангиогенеза, либо усугубление воспалительного процесса.

Некоторые исследования указывают на активацию фосфолипазы A2 (ФЛА2) в ишемизированном ГМ, что приводит к гидролизу мембранных фосфолипидов [186]. Фосфолипидный гидролиз и дисфункция митохондрий, индуцированные церебральной ишемией, приводят к образованию активных форм кислорода (АФК). Известно, что заряженная фосфолипидная липосома активирует АФК-зависимый приток кальция и активацию инфламмасом типа

NLRP3 [157]. Таким образом, метаболизм и модификация липидов в ходе церебральной ишемии могут быть тесно связаны с запуском постишемического воспаления.

Роль белков в молекулярных процессах, связанных с повреждением нервной ткани. Белки групп высокой мобильности 1 (HMGB1) и пероксиредоксина (Prx) являются основными белковыми молекулами, связанными с нарушением целостности ткани – DAMP белками в ишемизированном ГМ. Их активация происходит в различные фазы воспалительного процесса [206]. Белок HMGB1, который обычно локализуется внутри ядра клеток ГМ, высвобождается во внеклеточное пространство в гиперострой фазе (в течение нескольких часов после инсульта; [192]) или проникает в головной мозг из периферического кровотока в результате нарушения ГЭБ посредством повышения проницаемости сосудов [237]. В свою очередь, белки семейства Prx высвобождаются в острой и подострой фазах (12-72 часа после инсульта; [206]) под влиянием повышения уровня АФК и напрямую стимулируют активацию инфильтрации ткани иммунными клетками через TLR-опосредованный сигнальный путь.

S100A8 и S100A9 (кальций-связывающие белки, вовлеченные в ряд этапов клеточного цикла), Mgr8 и Mgr14 (эндогенные активаторы TLR-4) и активируемый холодом РНК-связывающий белок (CIRP) также являются молекулами DAMP, несмотря на то, что их роль в патогенезе постишемического воспаления до сих пор неясна [172, 221]. Воспалительные реакции с участием этих белковых молекул DAMP осуществляются посредством активации рецепторов TLR-2, TLR-4 и RAGE (трансмембранный белок к иммуноглобулинам). Сигнальные пути с участием TLR-2 и TLR-4 активируются при ишемическом инсульте [125]. Именно поэтому антитела блокирующие TLR-2 обладают нейропротекторными свойствами при повреждениях ГМ [239]. Модулировать повреждение ГМ при ишемии возможно посредством ингибирования TLR-4, в результате чего

подавляется оксидативный стресс и нейрональный апоптоз [218]. Рецептор CD14, который является ко-рецептором TLR-4, также может быть вовлечен в процесс постишемического воспаления [195]. Белок теплового шока gp96 является другой целью для фармакологического воздействия, так как участвует в регуляции как TLR-2-, так и TLR-4-активируемого сигнального пути [236].

Неизвестно активируют ли белковые DAMP молекулы инфламмасомы. Последние исследования показывают, что агрегированный белок ASC (адаптерный компонент инфламмасомы) высвобождается во внеклеточное пространство после смерти клеток, активируя, таким образом, инфламмасомы в окружающих зону поражения иммунных клетках [108]. Активация инфламмасом посредством полимеризации ASC приводит к активации каспазы-1 и смерти клеток через пироптоз (процесс в ходе которого иммунные клетки опознают сигналы повреждения и вследствие этого погибают). Эти механизмы активации инфламмасом при ишемическом повреждении ГМ еще только предстоит исследовать.

Роль белков, модифицированных сахарами в молекулярных процессах, связанных с повреждением нервной ткани. При изучении патогенеза нарушения мозгового кровообращения (НМК) и разработке путей фармакологической коррекции всегда следует учитывать влияние старения, преморбидных факторов и окружающей среды на течение заболевания. Данные факторы оказывают значительное влияние на уровень выработки молекул DAMP, в то время как в эксперименте используются молодые здоровые лабораторные животные. Так, старение и продолжительная гипергликемия усиливают окисление липидов и белков AGE (белки, модифицированные сахарами в ходе реакции Амадори и Майяра) в организме [109, 119]. Белки AGE найдены в поврежденной ткани, например, в амилоидных отложениях, окруженных макрофагами у пациентов с амилоидозом [181]. Процесс выработки белков AGE обычно занимает достаточно длительное время, но в процессе воспаления могут

вырабатываться и значительно быстрее [232]. Глиоксаль и глицеральдегид (являются промежуточными продуктами метаболизма гексоз в ходе гликолиза) индуцируют формирование белков AGE в течение 1 недели [232]. Белки AGE потенциально могут быть молекулами DAMP, особенно у пожилых пациентов с ишемическим инсультом.

1.2. Пути реализации иммунного ответа при ишемическом поражении нервной ткани.

Провоспалительный потенциал иммунной системы. В условиях ОНМК запускается каскад гемодинамических и метаболических нарушений, активирующих механизмы воспалительной реакции. Активированные иммунные клетки и клетки ГМ являются основными триггерами постишемического воспаления, они вырабатывают воспалительные цитокины, хемокины и другие цитотоксические медиаторы, что ведет к затяжному воспалению и длительному отеку ГМ в течение нескольких дней после инсульта (Рис. 1).

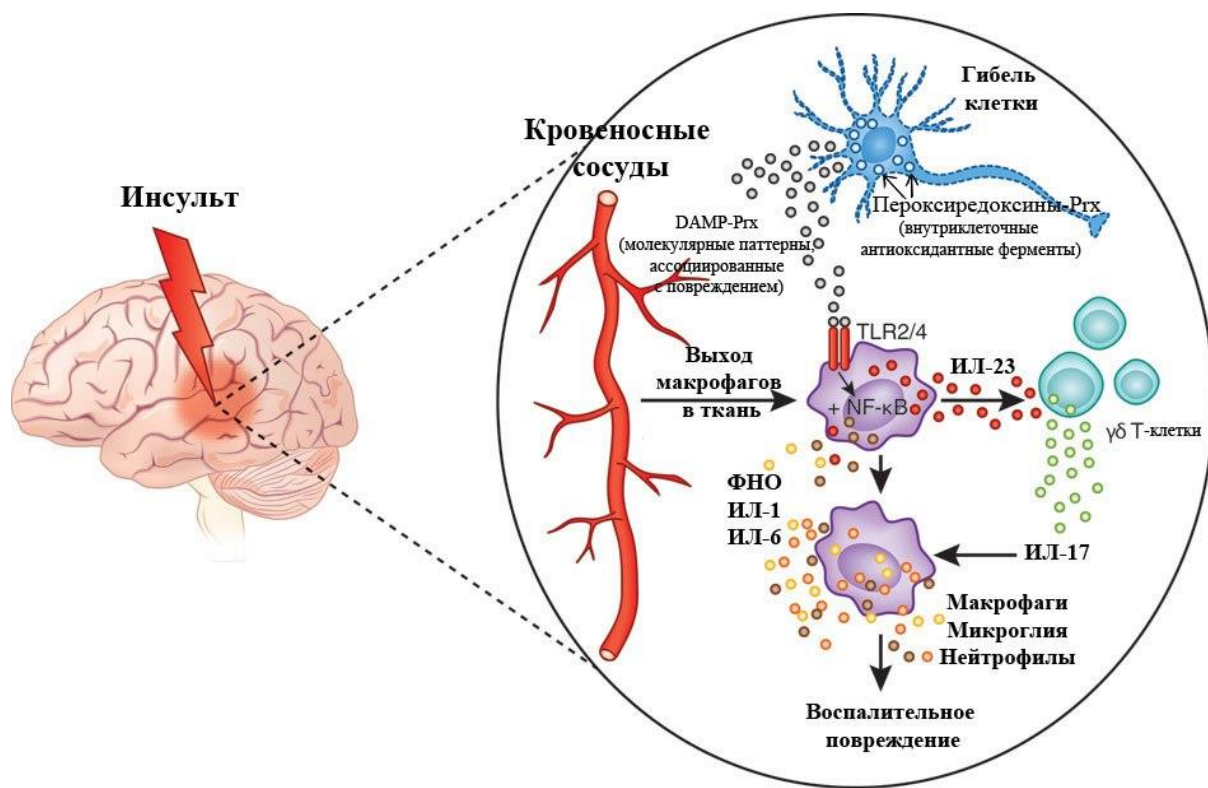


Рис. 1. Запуск иммунологических реакций, вследствие ишемического повреждения нервной ткани.

Известно, что астроциты совместно с двойным мембранным слоем эндотелиоцитов и базальной мембраной составляют структуру ГЭБ. С одной стороны, отростки астроцитов покрывают поверхность капилляров, а с другой – устанавливают связи с нейронами. Таким образом, астроциты, синтезируя провоспалительные цитокины, способствуют нарушению микроциркуляции и проницаемости ГЭБ [153], а также оказывают нейротоксическое действие по отношению к нейронам. Одновременно происходит гибель нейронов в «ядре» ишемии вследствие некроза с высвобождением продуктов распада – DAMP молекул в ишемизированную ткань, индуцируя дальнейшую активацию глиальных клеток и экспрессию провоспалительных цитокинов, что вызывает и поддерживает воспалительную реакцию в очаге ишемии [103, 143].

Инфильтрирующие иммунные клетки и реактивные глиальные клетки вырабатывают различные воспалительные медиаторы, среди которых наибольшего внимания заслуживают IL-1, IL-6 и TNF- α [99, 102, 174]. Синтез астроцитами IL-1 β и TNF- α запускает как процессы локального воспаления и отека ГМ, так и острофазовый системный ответ с активацией нейроиммунной и нейроэндокринной систем [43, 80]. IL-23 и IL-1 β активируют Т-клеточный врожденный иммунитет и стимулируют вторичное ишемическое повреждение тканей в ходе подострой фазы ишемии ГМ [162, 207]. IL-1 регулирует повреждение как минимум во время острой фазы воспаления, а эндогенный антагонист IL-1 потенциально обладает нейропротекторными свойствами, что уже показано в ходе нескольких исследований на животных [102]. Повышение уровня IL-6 после инсульта ассоциируется с повышенным риском осложнений [118]. Таким образом, антагонисты IL-6 могут увеличить вероятность благоприятного исхода ишемического инсульта.

Существование таких провоспалительных медиаторов, включая молекулы DAMP, продлевает постишемическое воспаление и служит угрозой для процесса восстановления поврежденной нервной ткани.

Избыточная проницаемость и экспрессия эндотелиоцитами ГЭБ селектинов, хемокинов и молекул адгезии облегчает диапедез нейтрофилов и макрофагов из системного кровотока через эндотелий в паренхиму мозга. Дальнейшая миграция по градиенту хемотаксических стимулов ведет к аккумуляции лейкоцитов в очаге воспаления, где они и осуществляют свои эффекторные функции [43, 153]. Таким образом, создается стартовая ситуация для развития специфического иммунного ответа. Мигрировавшие в очаг воспаления моноциты (макрофаги), поглотив продукты повреждения нервной ткани, направляются в региональный лимфатический узел, где происходит презентация ими антигена в структуре молекулы МНС (молекула главного комплекса гистосовместимости) Т-лимфоцитам (CD4⁺). По другому пути, фрагменты DAMP молекул мигрируют в общую циркуляцию через поврежденный ГЭБ, затем во вторичные лимфоидные органы, в которых при участии резидентных антигенпрезентирующих клеток, захвативших циркулирующие антигены мозга, запускается иммунная реакция [93].

Противовоспалительный потенциал иммунной системы. Как бы то ни было, постишемическое воспаление редко длится действительно долго, а пик воспалительного процесса наступает в течение 7 дней после инсульта [135, 155]. Механизмами, отвечающими за регуляцию процесса разрешения воспаления могут быть выработка противовоспалительных медиаторов, истощение запаса воспалительных медиаторов и активация противовоспалительных иммунных клеток [117]. На 3-7 сутки макрофаги мигрируют с периферии ишемической зоны в центр, где удаляют продукты тканевого распада. Клетки микроглии, как представители резидентных макрофагов в нервной ткани, способны к фагоцитозу нейтрофилов, что предотвращает выпуск дополнительных токсичных медиаторов [104], также они индуцируют синтез трофических факторов, противовоспалительных цитокинов, что способствует выживаемости нейронов и ослабляет процессы постишемического рубцевания [21, 142].

Таким образом, по истечению фазы воспаления, количество инфильтрирующих иммунных клеток значительно снижается, а оставшиеся в ишемизированном ГМ представители иммунной системы начинают вырабатывать противовоспалительные и/или нейротрофические факторы [207, 209]. Показано что DAMP молекулы могут участвовать в активации перерождения инфильтрирующих макрофагов в противовоспалительные типа M2, которые вырабатывают нейротрофические факторы и удаляют омертвевшую ткань [129, 145].

Активация инфламмасом в иммунных клетках активирует выработку IL-1 β и приводит к быстрой клеточной смерти этих самых клеток путем пироптоза. Пироптоз может быть одним из механизмов очищения поврежденной ткани от воспалительных иммунных клеток. За эту версию выступает также тот факт, что окрашивание погибающих клеток ГМ методом TUNEL (гистологический метод, позволяющий визуализировать клетки, содержащие фрагментированную ДНК) выявляет позитивную окраску макрофагов и глиальных клеток в ишемизированном ГМ [173].

Также, инфильтрирующими иммунными клетками и реактивными глиальными клетками после ишемического поражения ГМ вырабатываются основные противовоспалительные молекулы, такие как IL-10 и трансформирующий фактор роста- β (TGF- β). Повышенная выработка IL-10 в ишемизированном ГМ оказывает нейропротективное действие [188]. Не так давно был показан противовоспалительный эффект TGF- β посредством ингибирования воспаления нервной ткани в ходе подострой фазы церебральной ишемии [120]. Несмотря на то, что противовоспалительные свойства IL-10 и TGF- β доказаны, остается неясным могут ли они действовать до 7 дней после инсульта.

1.2.1. Активация опосредованного иммунными клетками восстановления нервной ткани.

Процесс восстановления повреждений в ГМ и регенерации нервных клеток происходит в ходе фазы разрешения воспаления. Процесс

восстановления нервной ткани очень сложно разделить с противовоспалительным процессом, так как у них есть очень много общих биохимических реакций.

Роль нейропротекторных факторов в восстановлении нервной ткани. Иммунные и глиальные клетки вырабатывают различные факторы роста [146]. Среди прочих, в ходе восстановления после повреждения ГМ, через неделю после инсульта, инфильтрирующими макрофагами вырабатываются инсулиноподобный фактор роста-1 (ИПФР-1) и фактор роста фибробластов-2 (ФФР-2). ИПФР-1 и ФФР-2 предотвращают клеточную смерть нейронов и глиии [150, 165]. ИПФР-1 также ускоряет восстановление после ишемического инсульта, усиливая нейрональную регенерацию, ремиелинизацию и синаптогенез [163]. Дальнейшие исследования должны прояснить механизм выработки ИПФР-1 и ФФР-2 в ишемизированном ГМ. Факторы роста ИПФР-1 и ФФР-2 кажутся сейчас одними из самых действенных молекул, обладающих нейропротекторными свойствами [165]. Применение ФФР-2 показывает многообещающие эффекты по нейропротекции ишемизированной ткани в исследованиях на животных, однако клинические испытания ФФР-2 не показали убедительных результатов [100, 140, 141, 158]. Факторы роста позволяют оказывать нейропротекторный эффект, а также восстанавливающий эффект путем индуцирования нейрональной проводимости и обновления межнейрональных связей или обеспечения пролиферации и дифференцировки стволовых клеток [147].

На данный момент выделено еще несколько многообещающих нейропротекторов, таких как эритропоэтин, антагонист рецепторов к IL-1 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-SCF). Все эти препараты сейчас находятся на стадии клинических испытаний [210]

Совсем недавно пристальное внимание ученых привлек нейропротекторный эффект простагландина E2 (ПГЕ-2) и четырех рецепторов к нему (EP1, EP2, EP3 и EP4). Активация EP2-сигнального

каскада оказывает защитное действие на нервную ткань в ходе ишемического повреждения ГМ. У мышей с дефицитом этого рецептора значительно увеличивалась площадь пораженной ткани [177]. Активация EP4-рецептора, экспрессируемого как нейронами, так и ишемизированными эндотелиальными клетками, также оказывает нейропротективное действие при ишемическом поражении ГМ [168]. Назначение агонистов EP-4 уменьшает площадь пораженной ткани и снижает неврологический дефицит. В модели неонатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии ингибирование сигнальной системы EP-1 рецептора или активация сигнальных систем EP-2, EP-3 и EP-4 модулирует процесс ишемического повреждения ГМ [220].

Некоторые липиды также оказывают противовоспалительное действие и стимулируют регенерацию нервной ткани [204]. Церебральная ишемия усиливает активность ФЛА2, что приводит к гидролизу фосфолипидов клеточной мембраны [205]. Несмотря на то что сама по себе ФЛА2 оказывает цитотоксический эффект, так как нарушает целостность клеточной мембраны, она также вырабатывает производные докозагексаеновой кислоты и лизофосфолипиды посредством фосфолипидного гидролиза. Лизофосфолипиды активируют и усиливают рост аксонов [205, 212].

В результате экспериментального исследования было установлено, что внутривенное введение нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) при моделировании инсульта у крыс уменьшает размер инфаркта, значительно снижает неврологический дефицит, усиливает миграцию прогениторных клеток от субвентрикулярной зоны к пери-ишемизированной области коры ГМ, увеличивает продукцию тучных клеток в зубчатой извилине гиппокампа и стимулирует их дифференциацию в нейроны [185].

Известно, что существует тесная взаимосвязь динамики титра аутоантител к фактору роста нервов (NGF) с клиническим исходом инсульта и степенью восстановления нарушенных неврологических функций, что подчеркивает роль аутоагрессии против нейротрофинов в развитии

недостаточности трофического обеспечения мозга и прогрессировании повреждающих ишемических процессов [30].

Роль нейропротекторных клеток в восстановлении нервной ткани.

Молекулы DAMP активируют глиальные клетки и инфильтрирующие иммунные клетки, что ведет к постишемическому воспалению. Парадоксально, но этот механизм приводит также к клеточной смерти инфильтрирующих макрофагов и активации противовоспалительных иммунных клеток, участвующих в восстановлении тканей. Эти клетки называются макрофагами типа M2 (в отличие от макрофагов типа M1 с провоспалительным фенотипом). Многие исследователи описывают маркеры макрофагов типа M2: аргиназа-1 (Arg1), хитиназа типа Ym и митогенный фактор индуцируемый гипоксией (Relma). Эти маркеры являются внутриклеточными ферментами, вовлеченными в синтез коллагена и цикл клеточного деления. Таким образом, ферменты M2 макрофагов участвуют в восстановлении тканей [138]. Маркеры M2 появляются в ишемизированном ГМ одновременно с медиаторами воспаления и маркерами макрофагов типа M1. В то же время, некоторые авторы утверждают, что макрофаги, на поверхности которых расположены маркеры M2, не всегда проявляют нейропротекторные свойства [133].

В ходе постишемического воспаления некоторые популяции макрофагов и микроглии начинают обладать защитными свойствами по отношению к нервной ткани [165]. Астроцитами вырабатывается белок галектин-1, который регулирует клеточную пролиферацию и предположительно является активатором противовоспалительных свойств макрофагов и клеток микроглии [194, 213], а также обладает нейропротекторным эффектом по отношению к поврежденным ишемией тканям ГМ [193].

Так как, самого по себе подавления воспалительного процесса недостаточно для того, чтобы защитить ГМ от поражения тканей, обусловленного ишемией, то разрешение постишемического воспаления

может быть усилено посредством активации специфических популяций макрофагов и микроглии. Таким образом, механизмы воспаления играют решающую роль в патогенезе ОНМК, оказывая как пагубное воздействие с прогрессирующим повреждением тканей, так и благотворное – во время восстановления и репарации [103].

1.3. Особенности нейроиммунной дисфункции при нарушениях мозгового кровообращения.

Расшифровка механизмов взаимодействия нервной системы (НС) и иммунной системы (ИС) является ключом к пониманию патогенеза ОНМК и основой для поиска способов их лечения. Перспективным направлением в последние годы стало изучение системного иммунного ответа в условиях развития патологии ЦНС.

Анализ литературных данных о параметрах иммунного статуса при цереброваскулярной патологии позволил выявить, что ее развитие в подавляющем большинстве случаев сопровождается лейкоцитозом в сочетании с относительной лимфопенией, дефицитом Т-клеточного звена иммунитета (снижение Т-лимфоцитов зрелых (CD3+), иммунорегуляторных (CD4+), цитотоксических (CD8+)) [42, 65, 97] и активацией гуморального иммунного ответа с увеличением содержания в крови В-лимфоцитов (CD19+, CD20+), Ig A, M, G и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) [12, 42, 65].

Данные литературы об изменениях показателей иммунного статуса в зависимости от типа инсульта противоречивы. Например, в одном исследовании уровень цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) был выше при геморрагическом инсульте в сравнении с ишемическим [42], в другом – достоверно ниже [12]. Данный факт позволяет говорить о том, что отдельные показатели иммунного статуса могут применяться в оценке прогноза течения и функционального исхода заболевания, но для дифференциальной диагностики типа инсульта эти показатели значения не имеют [81].

При крайне тяжелом течении инсульта отмечались более выраженная степень лимфопении, уменьшение Т-звена иммунитета (Т-лимфоциты, Т-хелперы) [42, 79] и активация гуморального ответа (увеличение уровня Ig А и ЦИК) [42]. Показатели иммунного статуса коррелировали с функциональным исходом: чем ниже уровни Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Ig М и выше Ig А, тем тяжелее степень инвалидизации и выше риск летального исхода [42].

Выраженность нарушений иммунитета у больных в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта (ИИ) зависела от локализации патологического процесса: у больных с правосторонней локализацией наблюдалось достоверное снижение зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), субпопуляции Т-хелперов (CD4+) и Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+) [21, 97], а также NK-клеток [70].

Таким образом, общая картина изменений иммунного статуса у больных в остром периоде НМК представлена сочетанием признаков дисрегуляции клеточного и гуморального иммунитета, происходящей в большинстве случаев на фоне нормально функционирующей ИС, а явления иммунной недостаточности рассматриваются как транзиторные [41].

1.4. Регуляция иммунного ответа при патологии нервной системы.

ИС при всей своей автономности находится под контролем нейроэндокринных воздействий. Какие же механизмы регулируют системные иммунные изменения при ОНМК?

Существуют исследования, свидетельствующие о том, что выявленный иммунный дисбаланс у больных ОНМК может быть следствием острого иммунодефицитного состояния на фоне стресс-ишемии [30, 191], которое приводит к подавлению функции лимфоцитов и уменьшению их количества в органах периферической лимфатической системы, снижению естественной функции NK-клеток и смещению баланса Т-хелперы 1 типа/Т-хелперы 2 типа в сторону преобладания Т-хелпер 2-цитокинового ответа [3, 143, 187]. Описаны два основных механизма, которые вызывают иммуносупрессию после развития инсульта: активация гипоталамо-гипофизарно-

надпочечниковой системы с синтезом надпочечниками глюкокортикоидов (ГКК) и стимуляция симпатoadреналовой системы с высвобождением катехоламинов (КА), в результате чего ГКК и КА тормозят продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IFN- γ , кроме того, КА способны к опосредованному IL-10 угнетению продукции IL-1 β и TNF- α , тогда как IL-1 β и IL-6 являются прямыми индукторами данных механизмов [1, 2, 143, 196].

Особое значение имеет способность ГКК вызывать апоптоз лимфоцитов преимущественно в селезенке и тимусе, чем в лимфатических узлах, что является возможной причиной Т-клеточного дефицита при ОНМК [42, 169]. Сходным эффектом обладает адренокортикотропный гормон (АКТГ), синтез которого индуцируется IL-1 за счет прямого действия на гипофиз. Влияние АКТГ обусловлено как усилением секреции ГКК, так и собственным иммунодепрессивным действием [1].

Активация гуморального звена ИС при ишемическом инсульте рассматривается как отражение аутоиммунной реакции на поступление нейроантигенов в периферическую кровь и выработки нейроаутоантител. Кроме того, возможна компенсаторная активация гуморальной составляющей иммунного ответа, связанной с функцией Т-хелперов 2 типа, в ответ на угнетение клеточного механизма Т-хелперов 1 типа [42].

Также изменения иммунного статуса при ОНМК могут быть следствием поражения нервных центров, регулирующих иммуногенез [42].

Учитывая характер изменений иммунного статуса в острый период инсульта, явление иммуносупрессии имеет важное патогенетическое значение с целью ослабить аутоиммунную атаку против ЦНС и уменьшить зону постинсультного поражения. Вместе с тем, постинсультная иммунная депрессия увеличивает частоту инфекционных осложнений, что негативно влияет на течение и функциональный исход заболевания [155].

1.4.1. Взаимодействие головного мозга и иммунной системы после инсульта.

В результате ишемии ГМ происходит нарушение гомеостаза и сбалансированного взаимодействия в работе двух систем: нервной и иммунной [178]. Соответственно на течение и исход инсульта влияют как длительность ишемии и звенья патогенеза со стороны нервной системы, так и иммунологически обусловленные факторы, активируемые в результате случившегося повреждения ткани. Знание механизмов взаимодействия иммунной системы и головного мозга очень важно для выбора правильной терапии и прогноза вариантов исхода инсульта.

С одной стороны, имеется большое количество клинических и литературных данных, показывающих, что в результате инсульта происходит депрессия иммунной системы и возрастает риск развития инфекционных заболеваний, что негативно сказывается на состоянии пациентов [127, 131]. В случае если депрессия иммунной системы длительная, стадия разрешения воспаления с очисткой от частиц некроза и последующая регенерация не наступают, и данный воспалительный процесс может перейти в хроническую форму.

В то же время существует мнение, что супрессия ИС после инсульта оказывает и положительное влияние на течение данной патологии, так как неконтролируемое воспаление может привести к аутоиммунным осложнениям [136]. В ГМ функционирующем в нормальном режиме провоспалительные молекулы и медиаторы вырабатываются только в небольших количествах, но в результате ишемического повреждения их секреция резко возрастает, что приводит к проявлению воспалительного фенотипа в пораженной ткани.

Заключение. Перечисленные факты и аспекты, клинические и литературные данные о взаимодействии нервной и иммунной системы сформировали четкое представление о функциональной значимости их интеграции, особенно в условиях патологии, когда в реализацию

патофизиологического пути включаются все звенья, отвечающие за гомеостаз. Перспективность исследований в данной научной области позволит повысить эффективность медицинской помощи больным, перенесшим инсульт, предоставив возможность более ранней фармакологической коррекции на патогенетическом уровне.

Таким образом, характер взаимодействия ГМ как с системой врожденного, так и с системой адаптивного иммунитета, является очень важным фактором определяющим степень повреждения ткани, объем воспалительной реакции после инсульта и регенерации после повреждения. В связи с этим, воздействие на взаимодействия между этими системами может защитить ГМ, стимулировать регенерацию и предотвратить системные осложнения. Знание механизмов, вовлеченных в эти процессы, позволит в перспективе сдвигать равновесие системы в сторону регенерации.

1.5. Перспективы применения фенильных производных ГАМК и глутаминовой кислоты в терапии ишемического инсульта.

До сих пор достоверный терапевтический эффект при назначении в первые 3 часа с момента развития ишемического инсульта оказывали только тромболитики [107], но потенциальные побочные эффекты этого вида лечения ограничивают круг пациентов, которым можно их назначать. Такие пациенты составляют приблизительно до 5-10% всех случаев развития инсульта [201, 231]. Кроме того, следует учесть, что не у всех пациентов, у которых применяются тромболитики, достигается адекватная реперфузия. Таким образом, в данном исследовании акцентировано внимание на лечении ОНМК нейропротекторами с целью предотвращения гибели клеток, которая возникает в течение нескольких часов или нескольких дней с момента развития инсульта [101, 134, 216].

Гамма-аминомасляная и глутаминовая кислоты являются основными нейромедиаторами в ЦНС. ГАМК играет важную роль в углеводном и аминокислотном обмене в ГМ, способствует нормализации метаболических процессов в нервной системе, активирует энергетические процессы мозга,

повышает дыхательную активность тканей, улучшает утилизацию мозгом глюкозы, усиливает его кровоснабжение [68, 110]. Глутаминовая кислота принимает участие в азотистом обмене, является стимулятором окислительно-восстановительных процессов в мозге, нормализует обмен веществ и повышает устойчивость организма к гипоксии [69, 179, 183].

ГАМК и глутамат, а также их производные часто находят применение при лечении цереброваскулярных заболеваний, имеющих ишемический характер. Это обусловлено тем, что аминокислоты прямо или опосредовано, принимают участие в регуляции всех основных нервных процессов [59].

Соединения, созданные на основе ГАМК, глутаминовой кислоты и их производных обладают мультитаргетным механизмом действия и способны влиять на различные звенья патогенеза при ишемическом повреждении ГМ. Например, в условиях экспериментального ишемического инсульта ГАМК и ее производные способствуют восстановлению мозгового кровотока и обладают антигипоксическими свойствами [5]. В экспериментах при острой ишемии мозга было выявлено, что некоторые производные глутаминовой кислоты обладают нейропротекторным действием, увеличивая потребление мозгом кислорода, что превосходило по эффективности глутамат [58]. Ацетилированное производное глутаминовой кислоты при экспериментальной гипобарической гипоксии у крыс оказывает антигипоксическое действие, причем доказано, что оно обладает большей активностью, чем сам глутамат [59].

На кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей Волгоградского государственного медицинского университета под руководством член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора И.Н. Тюренкова проводятся исследования по выявлению у производных ГАМК и глутаминовой кислоты разнообразных терапевтических эффектов. Отмечена способность ряда производных ГАМК проявлять антигипоксическую активность, уменьшать содержание продуктов перекисного окисления липидов и активировать ферменты антиоксидантной

системы в тканях ГМ [54, 56]. Показано позитивное влияние производных ГАМК на функцию эндотелия [11, 19, 54]. Аналоги ГАМК уменьшают явления эндотелиальной дисфункции у животных с недостаточностью половых гормонов [56, 73]. Новые производные ГАМК и глутаминовой кислоты в экспериментах повышают локомоторную, ориентировочно-исследовательскую активность животных, способствуют обучению и сохранению памятного следа, что говорит об их ноотропной активности [36, 48, 60].

Одними из перспективных веществ для коррекции неврологических и иммунных расстройств при нарушении мозгового кровообращения ишемического генеза являются фенильные производные ГАМК и глутаминовой кислоты – фенибут и соединение РГПУ-135 (нейроглутам).

В проведенных ранее исследованиях было показано, что фенибут проявляет психотропные и иммунотропные эффекты на различных моделях иммунопатологии [75, 88]. Фенибут улучшает функциональное состояние ГМ за счет нормализации метаболизма тканей и влияния на мозговое кровообращение, оказывает антиагрегантное и антиоксидантное действие [54], а также анксиолитический и психостимулирующий эффекты [48]. Доказано, что фенибут обладает высокой нейропротекторной и ноотропной активностью и композиция его с никотиновой кислотой оказывает нормализующее действие на систему гемостаза на фоне острой ишемии мозга [89].

Производное глутаминовой кислоты – гидрохлорид β -фенилглутаминовой кислоты с лабораторным шифром РГПУ-135 (нейроглутам) также обладает широким спектром психотропных эффектов: антидепрессантной, анксиолитической, нейропротекторной активностью и иммуностимулирующим действием [7, 14, 66] в сочетании с низкой токсичностью [13].

Принимая во внимание нейропротекторную и эндотелиопротекторную активность, иммунокорригирующие свойства, ноотропные эффекты,

антиоксидантное, противогипоксическое, антитромботическое и психотропное действие производных ГАМК и глутаминовой кислоты, считаем перспективным поиск среди них веществ, способных оказывать терапевтическое действие при острых нарушениях мозгового кровообращения ишемического типа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Материалы исследования.

Исследование выполнено на лабораторных животных: 430 мышам-самцам линии Balb/c массой 20-24 г 4-5 мес. возраста; 480 крысам-самцам линии Wistar массой 210-250 г 5-6 мес. возраста, полученных из питомников «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН (Россия, Московская область) и ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН (Россия, Ленинградская область). Содержание животных соответствовало всем правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Эксперименты проводились в соответствии с Приказом МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», с ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», с ГОСТ Р 51000.4-2011 «Общие требования к аккредитации испытательных лабораторий», Правилами GLP, с соблюдением Международных рекомендаций «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (The European Convention, 1986) и были одобрены Региональным Независимым Этическим Комитетом (ГУ Волгоградский Медицинский Научный Центр): протокол № 156-2012. Болезненные манипуляции и выведение животных из эксперимента проводились с использованием наркоза (хлоралгидрат 400 мг/кг).

Экспериментальные группы животных формировали после истечения 2-х недельного карантинного периода, необходимого для исключения влияния стресса в результате транспортировки на ход и результаты экспериментов и адаптации животных к новым условиям обитания. Животных размещали в пластиковых клетках по 5-6 особей (крысы) и 8-10 особей (мыши) в каждой в стандартных условиях вивария с естественным 12-ти часовым свето-темновым циклом, при температуре воздуха $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, влажности 40-60%, свободном доступе к воде и полнорационному гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92 «Комбикорма полнорационные

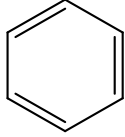
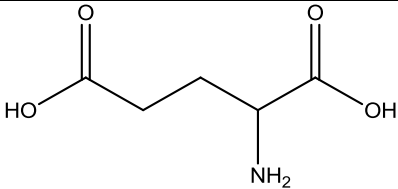
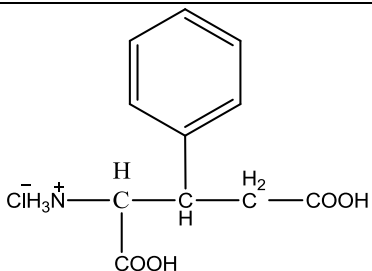
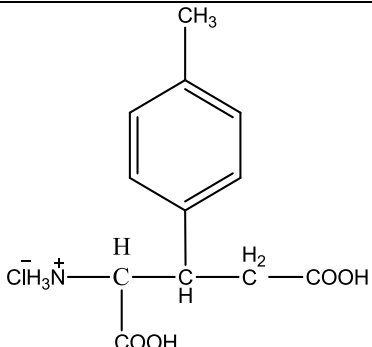
для лабораторных животных. Технические условия.»). При формировании экспериментальных групп проводили первичную рандомизацию животных по полу, возрасту и массе. Все манипуляции с животными проводили в один и тот же интервал времени (первая половина дня) во избежание влияния на результаты исследований суточных биоритмов при благоприятных климатических условиях (эксперименты не проводили в периоды резких изменений погоды).

В настоящей работе на первом этапе было проведено исследование иммуностропной активности и психотропного действия фенибута, глутаминовой кислоты и ее новых производных – соединений РГПУ-135 (нейроглутама) и РГПУ-202. Далее последовало изучение церебропротекторных свойств и влияния на иммунную систему животных фенибута, нейроглутама и церебролизина при нарушении мозгового кровообращения ишемического генеза в условиях измененной иммунореактивности. Производные органических кислот с лабораторными шифрами РГПУ, глутаминовая кислота и фенибут синтезированы на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А.Н. Герцена (Россия, г. Санкт-Петербург)¹. Лабораторные шифры, молекулярная масса и структурные формулы приведены в Таблице 2. В качестве препарата позитивного контроля был использован церебролизин, который применялся в виде раствора (церебролизин раствор для инъекций 215,2 мг/мл, EVER Neuro Pharma GmbH, Австрия). Церебролизин – это комплексный препарат, состоящий из низкомолекулярных пептидов и аминокислот и обладающий поливалентным действием, главным из которых являются нейропротекторное и нейротрофическое [28], способствует выживанию нейронов и улучшению проводимости, так же как это делает естественный фактор роста нервов (NGF) [200].

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

Таблица 2

Наименование и лабораторные шифры, молекулярная масса и структурные формулы изучаемых в работе веществ и химических соединений

Вещество, химическое соединение (наименование, лабораторный шифр)	Структурная формула	Молекулярная масса, а.е.м.
Фенибут	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}-\underset{\text{CH}}{\underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{---}}}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 	179,22
Глутаминовая кислота		147,13
РГПУ-135 (нейроглютам), β - фенильное производное глутаминовой кислоты		259,69
РГПУ-202, β -толильное производное глутаминовой кислоты		273,71

Все исследуемые вещества и соединения растворяли в физиологическом растворе *ex tempore* таким образом, что 0,1 мл раствора содержал исследуемую дозу на 100 г веса животного. Во всех экспериментальных сериях животные контрольных групп получали физиологический раствор в объеме 0,1 мл на 100 г веса.

Использовались наиболее эффективные дозы исследуемых соединений, выявленные при изучении нейропротекторной, эндотелиопротекторной, иммуностропной и психотропной активности [11, 19, 36, 75, 48, 54, 60]. Препараты позитивного контроля применялись в эффективных дозах по данным литературы [52, 67, 87].

2.2. Методы исследования.

2.2.1. Методы изучения влияния исследуемых веществ на иммунную систему и общую реактивность организма.

В экспериментальной серии по выявлению у исследуемых веществ иммуностропной активности функциональное состояние иммунной системы (ИС) животных оценивали на основании стандартных иммунофармакологических тестов: реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с определением титра антител; реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) с определением индекса воспаления реакции; латексного теста по изучению показателей фагоцитоза нейтрофилов периферической крови. При оценке действия веществ на гуморальный иммунный ответ изучали их влияние на индуктивную фазу этого ответа, т.е. вещества вводили одновременно с антигеном.

Для оценки активности специфического иммунного ответа на антигенный стимул в исследованиях использовали корпускулярный Т-зависимый антиген – эритроциты барана (ЭБ, производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия).

Оценку влияния веществ на гуморальное звено иммунного ответа проводили путем определения титра антител при иммунизации животных ЭБ в РПГА [61]. При постановке РПГА иммунизацию мышей линии Balb/c

проводили однократно внутрибрюшинно в дозе 5×10^7 ЭБ в объеме 250 мкл физиологического раствора через 1 час после введения изучаемого вещества при однократном применении и через 1 час после последнего введения изучаемого вещества при курсовом 14-ти дневном применении. Кровь для получения сыворотки брали через 7 дней после иммунизации животных. Реакцию гемагглютинации проводили в 96-луночных планшетах в объеме 50 мкл физиологического раствора, в котором последовательно двукратно разводили исследуемую сыворотку, начиная с разведения 1:5. После разведения сывороток ко всем лункам добавляли 50 мкл 1% взвеси ЭБ. Учет результатов реакции вели после инкубации планшетов в термостате в течение 2-х часов при $t + 37^\circ\text{C}$. Затем планшеты переставляли в холодильник при $t + 4^\circ\text{C}$ и через 18 часов окончательно учитывали результаты. Титр антител (наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается агглютинация ЭБ) выражали величиной $\log_{10} T$ ($\lg T$), где T – титр антител исследуемой сыворотки [75].

Эксперименты проводили по **Схеме 1А-Б**.

Оценку влияния веществ на клеточное звено иммунного ответа проводили в РГЗТ, характеризующейся двумя важными чертами – информативностью и простотой исполнения [61]. Сенсибилизация корпускулярным антигеном вызывает образование антигенспецифических Т-лимфоцитов. При повторном введении антигена эти Т-лимфоциты специфически взаимодействуют с ним и выделяют ряд провоспалительных цитокинов. Если разрешающая доза антигена вводится подкожно или внутрикожно, то на месте инъекции развивается воспалительная реакция, интенсивность которой легко измерить. При постановке РГЗТ для сенсибилизации мышам линии Balb/c однократно подкожно в межлопаточную область вводили 2×10^8 ЭБ в объеме 100 мкл физиологического раствора через 1 час после введения изучаемого вещества при однократном применении и через 1 час после последнего введения изучаемого вещества при курсовом 14-ти дневном применении.

Разрешающую дозу антигена 1×10^8 ЭБ в объеме 20 мкл физиологического раствора вводили на 5-й день после сенсibilизации под апоневротическую пластинку одной из задних конечностей. В контрлатеральную лапу в качестве контроля вводили физиологический раствор в таком же объеме. Учет интенсивности воспалительной реакции осуществляли через 24 часа после введения разрешающей дозы антигена. Индекс РГЗТ вычисляли по формуле:

$$\text{ИР} = \frac{M_{\text{оп}} - M_{\text{к}}}{M_{\text{к}}} * 100\%,$$

где ИР – индекс реакции;

$M_{\text{оп}}$ – масса «опытной» лапы;

$M_{\text{к}}$ – масса «контрольной» лапы.

Эксперименты проводили по **Схеме 1А-Б**.

Оценка влияния веществ на фагоцитоз. Метод основан на определении поглотительной способности нейтрофилов крови объектов фагоцитоза после их совместной инкубации. Предварительно готовили 1% рабочую суспензию частиц латекса размером 1,5 мкм («Диаэм», Россия). Через 24 часа после последнего введения изучаемого вещества при его курсовом двухнедельном применении животных выводили из эксперимента и производили забор венозной крови с гепарином. При постановке реакции в 96-луночном круглодонном планшете смешивали 50 мкл рабочего раствора латекса и 50 мкл крови и инкубировали при $t + 37^\circ\text{C}$, периодически встряхивая пробы. На каждую пробу через 2 часа совместной инкубации делали гематологический мазок. Окрашенные мазки просматривали под микроскопом. Среди 100 нейтрофилов подсчитывали активные (поглотившие хотя бы 1 латекс) и неактивные (не поглотившие ни одного латекса), а также количество поглощенных частиц латекса в них. На основании полученных данных рассчитывали следующие показатели: ФП – фагоцитарный показатель, процент клеток, вступивших в фагоцитоз (процент активных

нейтрофилов); ФЧ – фагоцитарное число, среднее число поглощенных частиц латекса активными нейтрофилами.

Эксперименты проводили по **Схеме 1Б**.

Для оценки общей реактивности организма животных в условиях поставленных экспериментов использовали общепризнанные, широко применяемые методы: общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы; оценка массы иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки).

Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Abacus junior B12 (Австрия). Для дифференциации лейкоцитов крови исследовали **лейкоцитарную формулу** в гематологическом мазке, просматривая его под микроскопом в иммерсионной системе, подсчитывая количество нейтрофилов (палочкоядерных, сегментоядерных), эозинофилов, базофилов, моноцитов и лимфоцитов [62].

Масса иммунокомпетентных органов. При изучении лимфопролиферативных процессов в иммунокомпетентных органах определяли массу тимуса и селезенки, выражая данные в процентах относительно веса животного.

Схема 1. Выявление иммулотропной активности исследуемых веществ.

А. Однократное применение исследуемых веществ.

День эксперимента	1	2	3	4	5	6	7	8
Гуморальное звено (РПГА)	 60 мин 							
Клеточное звено (РГЗТ)	 60 мин 						XXX	

Обозначения:



- Введение исследуемых веществ



- Иммунизация ЭБ в дозе $5 \cdot 10^7$ в 250 мкл физиологического раствора внутривенно



- Сенсибилизация ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ в 100 мкл физиологического раствора подкожно



- Разрешающая доза ЭБ $1 \cdot 10^8$ в 20 мкл физиологического раствора под апоневротическую пластинку задней левой лапы, в правую – 20 мкл физиологического раствора

XXX

- Регистрация интересующих параметров. Вывод животных из эксперимента.

Схема 1. Выявление иммуотропной активности исследуемых веществ. Исследование их психотропной активности в условиях развития первичного иммунного ответа на антиген.

Б. Курсовое (14-ти дневное) применение исследуемых веществ.

День эксперимента	1-13	14	15	16	17	18	19	20	21
Гуморальное звено (РПГА)		 50 мин  							XXX
Клеточное звено (РГЗТ)		 60 мин 						XXX	
Фагоцитоз			XXX						

Обозначения:



- Введение исследуемых веществ



- Тест ОП
Тест ЧБК



- Иммунизация ЭБ в дозе $5 \cdot 10^7$ в 250 мкл физиологического раствора внутривенно



- Сенсибилизация ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ в 100 мкл физиологического раствора подкожно



- Разрешающая доза ЭБ $1 \cdot 10^8$ в 20 мкл физиологического раствора под апоневротическую пластинку задней левой лапы, в правую – 20 мкл физиологического раствора

XXX

- Регистрация интересующих параметров. Вывод животных из эксперимента.

2.2.2. Модели изменения иммунореактивности.

Иммуносупрессия. Для подавления ИС животных использовали селективный иммунодепрессант – вещество циклоспорин, который широко применяется в клинике в области трансплантологии, а также для лечения тяжелых форм аллергических реакций и ревматоидного артрита. Вещество оказывает избирательное действие на Т-лимфоциты и реакции ими опосредованные (например, высвобождение ими цитокинов или продукцию антител зависимую от Т-хелперов), тормозит развитие реакций иммунитета клеточного типа и не обладает угнетающим эффектом на кроветворение и фагоцитарное звено иммунитета [84]. В нашей работе был использован препарат циклоспорин (торговое название «Экорал», IVAX Pharmaceuticals, Чешская Республика) в дозе 5 мг/кг [152, 240]. Циклоспорин вводили перорально ежедневно в первой половине дня на протяжении всего эксперимента. Ежедневная доза 5 мг/кг делилась на два приема (утро и вечер), поскольку вещество обладает коротким периодом полувыведения. В зависимости от кратности терапевтического введения исследуемых веществ циклоспорин применялся по **Схеме 2А-Б**.

Иммуностимуляция. Для создания фоновой активности ИС животных применяли иммуномодулирующее средство «Пирогенал» (Медгамал, филиал ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия), представляющее собой липополисахарид (ЛПС), выделенный из клеток *Salmonella typhi* и обладающее широким спектром действия (активирует гипоталамо-гипофизарно надпочечниковую гормональную ось, активирует фагоцитарную систему, стимулирует выработку IL-1 и IL-2, обладает положительным влиянием на регенерацию тканей при повреждении и др.) [84]. Пирогенал, в зависимости от применяемой дозы, оказывает как иммуномодулирующий и пирогенный эффекты (0,1-5 мкг/кг), так и цитокин-опосредованное повреждение органов, вплоть до развития эндотоксического шока с явлениями полиорганной недостаточности (10-30 мг/кг) [9, 26], поэтому нами была выбрана доза ЛПС 10 мкг/кг с частотой

внутрибрюшинного введения через день в первой половине дня на протяжении всего эксперимента. В зависимости от кратности терапевтического введения исследуемых веществ ЛПС применялся по **Схеме 2А-Б**.

2.2.3. Методы оценки двигательной активности, координации движений и мышечной силы у животных.

Для функциональной оценки психоневрологического статуса, особенностей поведения, когнитивных и мнестических функций животных применялись психофармакологические тесты в стандартной модификации: «Открытое поле» (ОП), «Черно-белая камера» (ЧБК) и «Rota-Rod» тест.

Тест «Открытое поле» позволяет оценить выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов, уровень эмоционально – поведенческой реактивности животного, стратегию исследовательского или оборонительного поведения [16]. Установка ОП для крыс представляет собой круглую площадку диаметром 97 см ограниченную бортами высотой 40 см, разделенную разметкой на 25 равных секторов, на пересечении которых находятся 16 отверстий (диаметром 2-3 см), имеется выделенная центральная зона поля. После помещения тестируемого животного в центр установки в течение 3-х минут регистрировали следующие параметры: число пересеченных квадратов (горизонтальная двигательная активность/локомоторная активность), количество свободных и пристеночных стоек (вертикальная двигательная активность), количество обследованных напольных отверстий (исследовательская активность), количество заходов в центральную зону ОП, число актов кратковременного и длительного груминга, количество фекальных болюсов. Об ориентировочно-исследовательской активности судили по сумме обследованных отверстий и стоек [18].

Схема 2. Изучение нейропротекторного и иммунокорригирующего действия исследуемых веществ при ишемии головного мозга в условиях неизмененного, подавленного и стимулированного иммунитета животных.

А. Применение исследуемых веществ в течение 3-х дней после моделирования ишемии головного мозга.

День эксперимента	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Неизменная ИС	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Подавленная ИС										
Стимулированная ИС										
Манипуляции						 				 XXX

Обозначения:

- - Неизменная иммунная система (ИС), никакие вещества для изменения состояния иммунитета не применялись
-  - Подавление иммунной системы (ИС) путем введения Циклоспорина в дозе 5 мг/кг с 1 по 9 день эксперимента
-  - Стимулирование иммунной системы (ИС) путем введения ЛПС в дозе 10 мкг/кг на 1, 3, 5, 7 и 9 дни эксперимента
-  - Перевязка левой общей сонной артерии на 2 день эксперимента, затем правой – на 6 день
-  - Введение исследуемых веществ через 3, 12, 24, 48, 72 часа (3-ий день) после моделирования ишемии головного мозга
-  - Тест ОП
Тест Rota-rod
- XXX** - Регистрация интересующих параметров. Вывод животных из эксперимента.

Схема 2. Изучение нейропротекторного и иммунокорригирующего действия исследуемых веществ при ишемии головного мозга в условиях неизмененного, подавленного и стимулированного иммунитета животных.

Б. Применение исследуемых веществ в течение 7-ми дней после моделирования ишемии головного мозга.

День эксперимента	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Неизменная ИС	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Подавленная ИС	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
Стимулированная ИС	○		○		○		○		○		○		○	
Манипуляции		⚡				⚡								 XXX

Обозначения:

— - Неизменная иммунная система (ИС), никакие вещества для изменения состояния иммунитета не применялись

● - Подавление иммунной системы (ИС) путем введения Циклоспорина в дозе 5 мг/кг с 1 по 13 день эксперимента

○ - Стимулирование иммунной системы (ИС) путем введения ЛПС в дозе 10 мкг/кг на 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13 дни эксперимента

⚡ - Перевязка левой общей сонной артерии на 2 день эксперимента, затем правой – на 6 день

△ - Введение исследуемых веществ через 3, 12, 24, 48, 72 часа (3-ий день) и на 4, 5, 6, 7 день после моделирования ишемии головного мозга


 - Тест ОП
 Тест Rota-rod

XXX - Регистрация интересующих параметров. Вывод животных из эксперимента.

Тест «Черно-белая камера» используется для выявления тревожных состояний у грызунов [17]. Установка представляет собой два смежных отсека размерами 30х30х30 см: темный – закрытый и ярко освещенный – открытый, соединенные через проход (8х8 см). Тестируемое животное помещали в светлый отсек установки и в течение 5 минут регистрировали следующие параметры: латентный период (ЛП) захода в темный отсек (время до первого захода в темный отсек), число заходов в темный и светлый отсеки и продолжительность нахождения в них, число выглядываний из темного отсека, количество исследовательских стоек, число актов кратковременного груминга [4].

Тест «Rota-Rod». Для оценки координации движений и мышечной силы животных использовали тест «Rota-Rod». Установка для теста (ООО «Нейроботикс», Россия) представляет собой горизонтальный стержень в комплексе с датчиками и программным обеспечением для автоматической регистрации времени падения животных. Стержень вращался с постоянной скоростью 20 об/мин. Регистрировали латентный период (ЛП) первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки [114].

2.2.4. Метод моделирование церебральной ишемии.

По данным ряда авторов, одномоментная двусторонняя перевязка общих сонных артерий (ОСА) у крыс приводит к гибели 50-70% экспериментальных животных в течение первых 2-3 суток наблюдения, что затрудняет изучение динамики восстановительного периода и оценку эффективности терапии [25, 58].

В связи с этим, для моделирования недостаточности мозгового кровообращения нами была выбрана модель поэтапной перевязки ОСА с интервалом в 3-е суток между окклюзией левой и правой сонной артерии, при которой снижается уровень летальности оперированных животных, что позволяет оценить динамику восстановительного периода [90]. После каждой перевязки ОСА участок мягких тканей обрабатывали раствором антисептика

(хлоргексидином), далее рану послойно ушивали и операционное поле обрабатывали 70% спиртом. В зависимости от продолжительности терапии смоделированной патологии исследуемые вещества вводили внутривентрикулярно через 3, 12, 48, 72 часа (3-ий день) – при лечении в течение 3-х дней или продолжали применение на 4, 5, 6, 7 дни после ишемии головного мозга (**Схема 3А-Б**).

2.2.5. Метод оценки неврологического статуса.

Для оценки церебропротекторного действия изучаемых веществ в условиях ишемии головного мозга (ИГМ), вызванной поэтапной окклюзией ОСА была использована балльная шкала оценки инсульта McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной (1996 г.) [22] (Таблица 3). При наличии у животного нескольких признаков неврологического дефицита баллы суммировались. Оценка неврологического статуса проводилась через 12, 24, 48, 72 часа и через 7 суток после необратимой окклюзии ОСА.

Таблица 3

Шкала оценки неврологического дефицита по McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной (1996 г.)

Оцениваемые симптомы	Присуждаемые баллы
вялость	0,5
тремор	1
односторонний полуптоз	1
двухсторонний полуптоз	1,5
односторонний птоз	1,5
двухсторонний птоз	1,5
слабость конечностей	1,5
манежность движений	2
парез 1,2,3,4 конечностей	2,3,4,5
паралич 1,2,3,4 конечностей	3,4,5,6
кома	7
летальный исход	10

2.2.6. Метод регистрации уровня локального мозгового кровотока.

Регистрацию уровня локального мозгового кровотока (МК в ус. ед.) проводили в теменной области головного мозга крыс (в проекции средней мозговой артерии) с помощью ультразвукового доплерографа «Минимакс-Доплер-К» (ООО «СП-Минимакс», Россия), с использованием датчика с рабочей частотой в 25 Гц. Для этой цели датчик доплерографа фиксировали в стереотаксической установке и устанавливали на теменной области коры головного мозга на расстоянии 6-7 мм дистальнее основания средней мозговой артерии по направлению ее центральной ветви [91]. В виде контактной среды между датчиком и сосудах использовали гель для проведения ультразвукового исследования. Во время регистрации животные находились под наркозом (хлоралгидрат 400 мг/кг).

2.2.7. Метод определения постишемического отека мозговой ткани.

Выраженность постишемического отека головного мозга оценивали по степени гидратации ткани мозга. Для этого после декапитации животного мозг извлекали из черепной коробки, его поверхность осушали салфеткой, взвешивали, а затем помещали в сухожаровой шкаф на 24 часа при температуре 80°C. Ткань головного мозга после сушки повторно взвешивали и рассчитывали процент потерянной воды по формуле [224]:

$$\% \text{ гидратации} = \frac{M_{\text{вл}} - M_{\text{сух}}}{M_{\text{вл}}} * 100\% ,$$

где $M_{\text{вл}}$ – масса головного мозга влажная (до высушивания);

$M_{\text{сух}}$ – масса головного мозга сухая (после высушивания).

2.2.8. Метод иммуноферментного анализа.

Определение концентрации белков и активных молекул осуществляли в сыворотке крови методом твердофазного ИФА с использованием наборов фирмы «Cusabio-Rat» (Китай) на ИФА-комплексе фирмы Тесан (Австрия). В работе исследовали уровень следующих биологически активных агентов: IL-1 β пг/мл, IL-6 пг/мл, IL-4 пг/мл, NSE нг/мл (нейронспецифическая енолаза),

MBP нг/мл (основной белок миелина), BDNF пг/мл (нейротрофический фактор головного мозга), NGF пг/мл (фактор роста нервов).

Обработка полученных данных проводилась с помощью пакетов программ MS Excel (Microsoft, США), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., США) и Statistica 8.0 (StatSoft, США). Статистическая обработка результатов экспериментов в зависимости от характера данных проводилась с использованием параметрических и непараметрических критериев: t критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони; критерий Фишера; критерий хи-квадрат; ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса с пост-хок тестами Ньюмена-Кейлса и Данна для множественных сравнений. Проверка данных на нормальность осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Статистически значимыми признавались различия при уровне $p \leq 0,05$ [23, 72].

2.3. Дизайн исследования.

Структура диссертационного исследования представлена в Таблице 4.

Эксперименты проводили по представленным выше **Схемам 1-2.**

Дизайн исследования.

Коморбидный фон	Методы исследования, экспериментальная модель	Вещества, способ и кратность введения	Показатели, характеризующие иммунную систему	Показатели, характеризующие нервную систему	Лабораторные животные
1	2	3	4	5	6
I. Выявление иммуотропной активности исследуемых веществ. Исследование их психотропной активности в условиях развития первичного иммунного ответа на антиген (Схема 1А-Б).					
	Постановка РПГА (оценка гуморального звена иммунного ответа)	Однократное внутрибрюшинное введение: Фенибут-25 мг/кг Глутаминовая кислота-200 мг/кг Нейроглютам-26,78,234 мг/кг РГПУ-202-27,81,243 мг/кг	Титр антител		Мыши линии Balb/c
		Курсовое 14-ти дневное внутрибрюшинное введение: Фенибут-25 мг/кг Глутаминовая кислота-200 мг/кг Нейроглютам-26, 78 мг/кг РГПУ-202-27, 81 мг/кг	Титр антител	ОП, ЧБК дважды 1) до иммунизации 2) на 3-ий день после иммунизации	
	Постановка РГЗТ (оценка клеточного звена иммунного ответа)	Однократное внутрибрюшинное введение: Фенибут-25 мг/кг Глутаминовая кислота-200 мг/кг Нейроглютам-26,78,234 мг/кг РГПУ-202-27,81,243 мг/кг	Индекс воспаления		Мыши линии Balb/c
		Курсовое 14-ти дневное внутрибрюшинное введение: Фенибут-25 мг/кг Глутаминовая кислота-200 мг/кг Нейроглютам-26, 78 мг/кг РГПУ-202-27, 81 мг/кг	Индекс воспаления		

Коморбидный фон	Методы исследования, экспериментальная модель	Вещества, способ и кратность введения	Показатели, характеризующие иммунную систему	Показатели, характеризующие нервную систему	Лабораторные животные
1	2	3	4	5	6
	Постановка латексного теста с нейтрофилами периферической крови	Курсовое двухнедельное внутрибрюшинное введение: Фенибут-25 мг/кг Глутаминовая кислота-200 мг/кг Нейроглютам-26, 78 мг/кг РГПУ-202-27, 81 мг/кг	Фагоцитарный показатель, фагоцитарное число		Мыши линии Balb/c
II. Изучение нейропротекторного и иммунокорригирующего действия исследуемых веществ при ишемии головного мозга в условиях неизмененного, подавленного и стимулированного иммунитета животных (Схема 2А-Б).					
Неизменная иммунная система	Ишемия головного мозга, вызванная поэтапной необратимой окклюзией общих сонных артерий	Внутрибрюшинное введение в течение 3 и 7 дней после ишемии головного мозга: Фенибут-25 мг/кг Нейроглютам-26 мг/кг Церебролизин-2,5 мл/кг	Концентрация IL-1 β , IL-6 и IL-4 в сыворотке крови, масса тимуса и селезенки в процентном отношении к массе тела, общее количество лейкоцитов и их субпопуляций	Динамика смертности, неврологический дефицит, ОП, Rota-Rod тест, уровень мозгового кровотока, отек мозговой ткани, концентрация BDNF, NGF, NSE и MBP в сыворотке крови	Крысы линии Wistar возраста 5-6 мес.
Подавленная иммунная система					
Стимулированная иммунная система					

ГЛАВА 3. ИММУНОТРОПНАЯ И ПСИХОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ГАМК И ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ.

В настоящее время сведения о тесной взаимосвязи между нервной и иммунной системами не вызывают никаких сомнений [115]. Также имеются многочисленные данные о том, что нарушения нормальных взаимодействий между этими системами способствуют возникновению ряда заболеваний или определяют характер их течения [3, 55].

Участие ГАМК - и глутаматергических механизмов описаны во многих нейроиммунных процессах [47, 75]. Многочисленные исследования свидетельствуют о прямом участии глутаминовой кислоты и глутаминовых рецепторов различных типов в функционировании эндокринной и иммунной систем [47]. Рецепторы различных нейромедиаторов, в том числе и нейроаминокислот обнаружены на мембранах иммунокомпетентных клеток [55], что позволяет считать их не только нейро-, но и иммуномедиаторами [10].

Изменения иммунологической реактивности при различных патологических состояниях ЦНС имеет прикладное значение, что делает актуальным создание новых и поиск среди зарегистрированных средств препаратов, обладающих свойствами нейроиммунотропности [111, 126, 215].

3.1. Иммуотропная активность производных ГАМК и глутаминовой кислоты.

На первом этапе работы исследовали влияние фенильного производного ГАМК – фенибута (25 мг/кг, доза обладающая разнообразным спектром активности по ранее проведенным исследованиям кафедры фармакологии и биофармации ФУВ [48, 54], фенильного производного глутаминовой кислоты – нейроглутама в дозах 26, 78 и 234 мг/кг, толильного производного глутаминовой кислоты – соединения РГПУ-202 в дозах 27, 81 и 243 мг/кг на гуморальное и клеточное звенья первичного иммунного ответа на антиген при однократном применении исследуемых веществ. Эксперименты проводили по **Схеме 1А** (см. Глава 2).

Далее по результатам выявленной иммуностропной активности разных доз исследуемых соединений отобрали наиболее перспективные дозы и оценили их влияние на развитие первичного иммунного ответа на антиген в РПГА и в РГЗТ и на показатели врожденного иммунитета в латексном тесте при курсовом двухнедельном применении. Эксперименты проводили по **Схеме 1Б** (см. Глава 2).

Полученные данные результатов экспериментов по изучению иммуностропной активности исследуемых веществ представлены по блокам оценки гуморального, клеточного звена иммунного ответа и фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови.

3.1.1. Влияния исследуемых веществ на гуморальный иммунный ответ при однократном и курсовом двухнедельном введении.

Однократное внутрибрюшинное введение вещества фенибут и нейроголутама в дозах 26 и 78 мг/кг стимулировало гуморальный иммунный ответ на корпускулярный антиген – ЭБ, при этом титр гемагглютининов возрастал на 38, 44 и 40% соответственно относительно группы животных, получавших физиологический раствор (контрольная) ($p \leq 0,05$). Дальнейшее увеличение дозы нейроголутама до 234 мг/кг и применение глутаминовой кислоты не оказывало влияния на выработку антиэритроцитарных антител, так как значения титра были сопоставимы с фоновыми в контрольной группе. Однократное введение соединения РГПУ-202 в диапазоне доз 27-243 мг/кг приводило к нарастанию гемагглютининов в среднем на 19-25%, что достоверно не превышало значений группы контроль (Рис. 2А).

Изучение влияния курсового введения исследуемых веществ показало, что через 7 суток после проведения внутрибрюшинной антигенной стимуляции мышей ЭБ титр гемагглютининов у животных, получавших фенибут, глутаминовую кислоту и нейроголутам в дозах 26 и 78 мг/кг был достоверно выше, чем у животных группы контроль на 45, 50, 67 и 65% соответственно ($p \leq 0,05$). Соединение РГПУ-202 в дозах 27 и 81 мг/кг не приводило к значимой выработке антиэритроцитарных антител и

увеличивало титр гемагглютининов на 12-21% соответственно относительно группы животных, получавших физиологический раствор (Рис. 2Б).

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о способности фенибута и нейроглутама в дозах 26 и 78 мг/кг стимулировать гуморальный иммунный ответ как при однократном, так и при курсовом двухнедельном их применении.

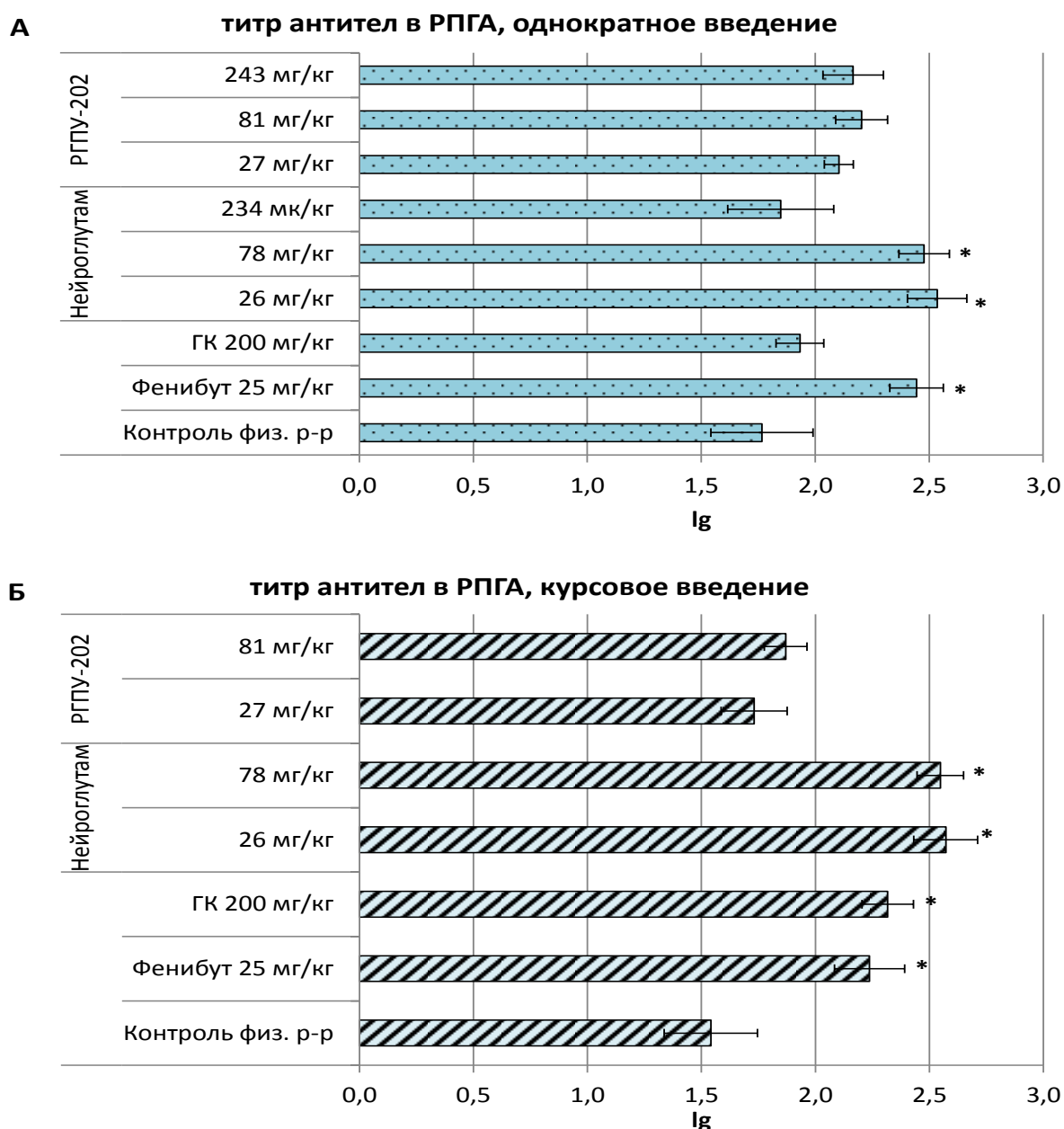


Рис. 2. Титр антител в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) при А) однократном и Б) курсовом внутривнутрибрюшинном введении исследуемых веществ

Примечание: ГК – глутаминовая кислота.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

** - по сравнению с животными группы Контроль.*

3.1.2. Влияния исследуемых веществ на клеточный иммунный ответ при однократном и курсовом двухнедельном введении.

При однократном внутрибрюшинном введении фенибут и нейроглутам в дозах 26 и 78 мг/кг оказывали значимое стимулирующее влияние на уровень Т-клеточного иммунного ответа. При этом, индекс воспаления в РГЗТ составил 18,1; 20,9; и 17,6% соответственно, что достоверно превышало индекс реакции в группе Контроль (12,4%) ($p \leq 0,05$). Дальнейшее увеличение дозы нейроглутама до 234 мг/кг и применение соединения РГПУ-202 в диапазоне доз 27-243 мг/кг не приводило к значимым изменениям индекса воспаления и его значения оставались на уровне показателя контрольной группы. При применении глутаминовой кислоты наблюдалось незначительное увеличение индекса РГЗТ до 14,3% (Рис. 3А).

Введение разрешающей дозы антигена животным опытных групп после двухнедельного применения фенибута способствовало формированию гиперчувствительности замедленного типа высокого уровня: индекс воспаления составил 25,6% против 21,7% в группе Контроль ($p \leq 0,05$). Напротив, применение глутаминовой кислоты, нейроглутама (26 и 78 мг/кг) и соединения РГПУ-202 (27 и 81 мг/кг) снижало индекс воспаления РГЗТ относительно значения контрольной группы, достоверно значимо нейроглутам в дозе 26 мг/кг (16,4%) и РГПУ-202 в дозе 81 мг/кг (15,5%) ($p \leq 0,05$) (Рис. 3Б).

При оценки действия веществ на Т-клеточное звено иммунитета наблюдалось значимое влияние фенибута, которое заключалось в активации клеточного иммунного ответа как при однократном, так и при курсовом двухнедельном применении. Нейроглутам в дозе 26 мг/кг, напротив, разнонаправленно влиял на индекс воспаления РГЗТ, увеличивая его при однократном применении и подавляя при курсовом двухнедельном. Полученные данные свидетельствуют о способности глутаминовой кислоты и ее производных – нейроглутама в дозе 26 мг/кг и соединения РГПУ-202 в

дозе 27 мг/кг при длительном применении подавлять реакции иммунной системы, опосредованные Т-клеточным звеном.

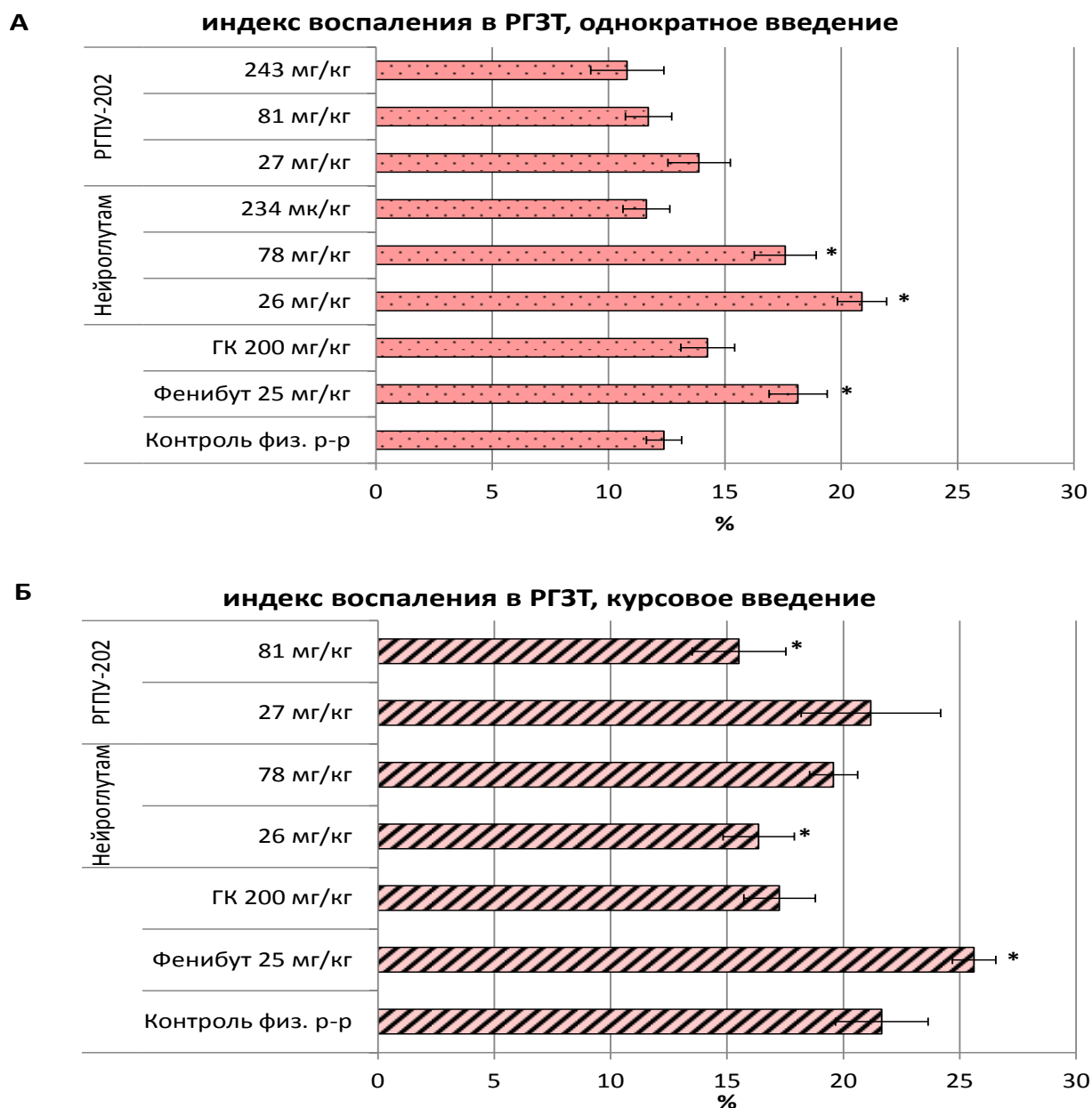


Рис. 3. Индекс воспаления в реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) при А) однократном и Б) курсовом внутрибрюшинном введении исследуемых веществ

Примечание: ГК – глутаминовая кислота.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

* - по сравнению с животными группы Контроль.

3.1.3. Влияния исследуемых веществ на фагоцитоз при курсовом двухнедельном введении.

Оценка влияния фенибута, глутаминовой кислоты и нейроглутама в дозах 26 и 78 мг/кг на фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови показала, что перечисленные вещества при курсовом двухнедельном применении достоверно увеличивали процент клеток, вступивших в фагоцитоз на 84, 33, 114 и 69% соответственно по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$). В тех же условиях эксперимента соединение РГПУ-202 в дозах 27 и 81 мг/кг не оказывала значимого влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов, так как фагоцитарный показатель оставался на уровне значения группы животных, получавших физиологический раствор (Таблица 5).

При изучении фагоцитарного числа, т.е. среднего количества поглощенных частиц латекса активными нейтрофилами следует отметить стимулирующее влияние фенибута и нейроглутама на данный показатель. Так, при двухнедельном введении фенибута и нейроглутама в дозах 26 и 78 мг/кг количество поглощенных частиц латекса было на 29, 25 и 23% больше соответственно по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$). Глутаминовая кислота при двухнедельном применении увеличивала значение фагоцитарного числа на 14%, а соединение РГПУ-202 в дозах 27-81 мг/кг не оказывала значимого влияния на данный показатель (Таблица 5).

По результатам изучения влияния исследуемых веществ на неспецифическую резистентность организма при курсовом двухнедельном их применении установлено, что фенибут в дозе 25 мг/кг и нейроглутам в дозах 26 и 78 мг/кг увеличивали такие показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови, как число активных нейтрофилов и количество поглощенных ими объектов фагоцитоза.

Таблица 5

Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови при курсовом внутрибрюшинном введении исследуемых веществ ($M \pm m$)

Группы		Фагоцитарный показатель (%)	Фагоцитарное число (количество)
Контроль		33,8±4,0	2,7±0,2
Глутаминовая кислота 200 мг/кг		45,0±2,2 *	3,1±0,2
Нейроглютам	26 мг/кг	72,1±3,8 *	3,4±0,1 *
	78 мг/кг	57,2±2,5 *	3,3±0,1 *
РГПУ-202	27 мг/кг	30,2±2,1	2,6±0,1
	81 мг/кг	31,7±3,2	2,8±0,3
Фенибут 25 мг/кг		62,1±2,1 *	3,5±0,2 *

Примечание: фагоцитарный показатель - % активных нейтрофилов; фагоцитарное число – количество поглощенных объектов фагоцитоза.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

** - по сравнению с животными группы Контроль.*

3.2. Психотропная активность производных ГАМК и глутаминовой кислоты при курсовом двухнедельном их применении в условиях развития иммунного ответа на антиген.

В данном блоке исследования было оценено поведение животных в тестах «Открытое поле» (ОП) и «Черно-белая камера» (ЧБК) при курсовом двухнедельном введении исследуемых веществ: фенибута (25 мг/кг), глутаминовой кислоты (200 мг/кг) и ее новых производных – нейроглутама (26 и 78 мг/кг) и соединения РГПУ-202 (27 и 81 мг/кг). Показания поведения регистрировали дважды: 1) через 40 мин после последнего из 14-ти дневного курса внутрибрюшинного введения веществ (до иммунизации животных); 2) на 3-ий день (через 48 часов) развития иммунного ответа на однократную иммунизацию животных корпускулярным антигеном – эритроцитами барана в дозе $5 \cdot 10^7$ в 250 мкл физиологического раствора внутрибрюшинно. Эксперименты проводили по **Схеме 1Б** (см. Глава 2.).

По ранее проведенным исследованиям оценки психотропной активности глутаминовой кислоты, ее новых производных – нейроглутама и РГПУ-202 и вещества фенибут, сделанными различными группами исследователей кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, можно

заклучить о наличии активирующего эффекта у глутаминовой кислоты [87]; активирующего и анксиолитического действия у нейроголутама [36] выраженного больше в дозе 26 мг/кг и у вещества фенибут [48]; седативной и анксиолитической активности соединения РГПУ – 202 [60] наиболее выраженной в дозе 81 мг/кг.

Антиген, попадая в организм, сам по себе является стрессорным агентом, не только изменяющим функциональное состояние клеток иммунной системы, но и вызывающий сложный комплекс нейроэндокринных сдвигов [20], таких как нарушение регулирования нейрональной активности посредством взаимодействия возбуждающих и тормозных нейромедиаторов, напряжение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси поддержания гомеостаза [49] и многое другое. Таким образом, целью настоящего исследования было выявить изменения в психоэмоциональном статусе животных в условиях развития иммунного ответа при иммунизации их корпускулярным антигеном и оценить психотропную активность исследуемых соединений при смоделированном состоянии.

У животных контрольной группы при развитии иммунного ответа на введение антигена отмечены изменения психоэмоционального статуса. Так в тесте «ОП» достоверно уменьшились показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, снизилось количество заходов в центральную зону, увеличилось число актов «тревожного» (кратковременного) груминга и количество фекальных болюсов (Рис. 4, Рис. 6). В тесте «ЧБК» уменьшалось число исследовательских стоек и количество переходов между светлым и темным отсеками, а также время до захода в темный отсек (ЛП) и суммарное время, проведенное в светлом отсеке (Рис. 5, Рис. 7). Изменения в перечисленных выше показателях указывают на наличие тревожного состояния у животных группы Контроль на фоне развития иммунного ответа.

Применение нейроглутама в дозах 26 мг/кг и 78 мг/кг и фенибута у лабораторных животных в условиях развития иммунного ответа на антигенный стимул приводило к увеличению локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности (Рис. 4), к снижению актов «тревожного» груминга, числа фекальных болюсов (нейрогглютам только в дозе 26 мг/кг) и увеличению количества заходов животных в центр поля (нейроглютам только в дозе 26 мг/кг) в тесте «ОП» относительно значений контрольной группы ($p \leq 0,05$) (Рис. 6). Полученные данные свидетельствуют о нивелировании признаков тревожности у животных, развивающихся на 3-ьи сутки после однократной иммунизации антигеном при применении нейроглутама и фенибута.

В тесте «ЧБК» у животных опытных групп, получавших нейроглютам в дозе 26 мг/кг и фенибут, отмечалось увеличение ЛП захода (времени до захода) в темный отсек, суммарного времени, проведенного в светлом отсеке (Рис. 7), также возрастало количество переходов между темным и светлым отсеками (нейроглютам в дозах 26 и 78 мг/кг) и число исследовательских стоек (нейроглютам в дозах 26 и 78 мг/кг) ($p \leq 0,05$) (Рис. 5). Полученные данные свидетельствуют о наличии у данных веществ анксиолитической активности и благоприятном влиянии на двигательную и исследовательскую составляющие поведения животных в условиях развития иммунного ответа на антиген.

При курсовом введении глутаминовой кислоты основной вклад в увеличение ориентировочно-исследовательской активности животных вносило увеличение количества пристеночных стоек (с опорой на борт установки), характеризующих ориентировочную реакцию настороженности и тревоги, что может свидетельствовать об умеренном повышении тревожности на фоне активирующего действия данного вещества (Таблица 6). Также, введение глутаминовой кислоты приводило к достоверному увеличению количества заходов животных в центр поля в тесте «ОП», что вероятнее всего связано с ее активирующим действием и повышением

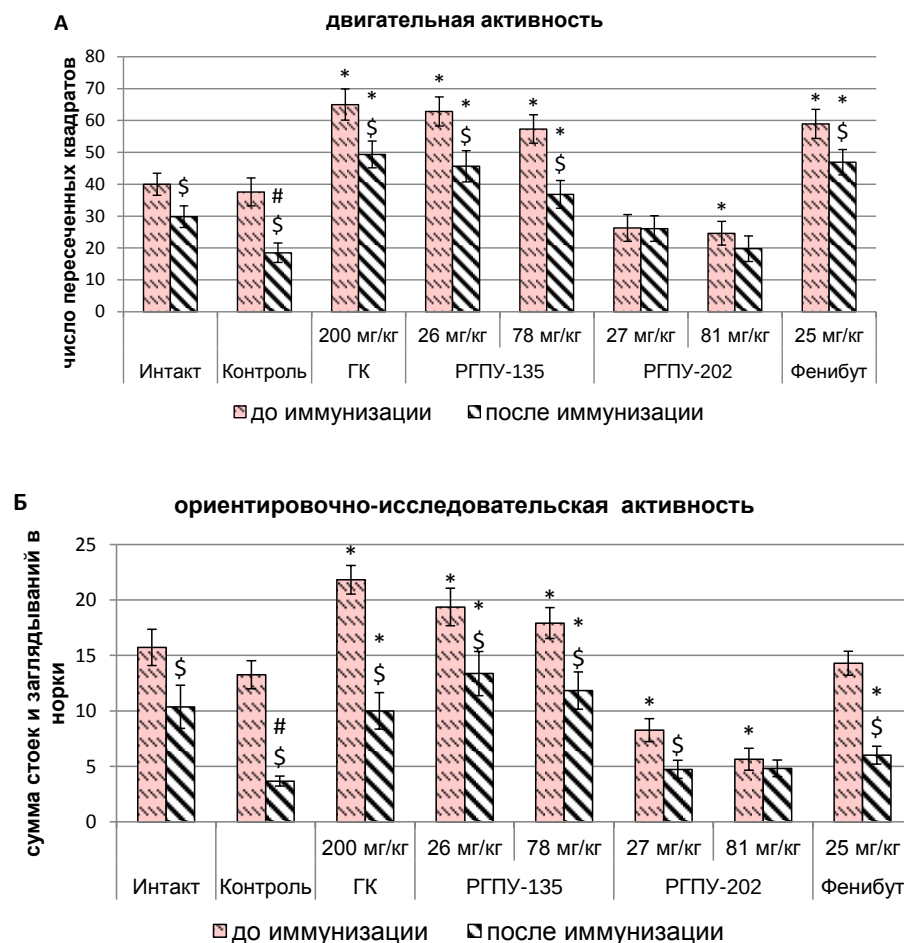


Рис. 4. Влияние исследуемых веществ на показатели активности поведения животных в тесте «Открытое поле» 1) после курсового введения (до иммунизации) и 2) на 3-ий день развития иммунного ответа на антигенный стимул (после иммунизации)

Примечание: ГК – глутаминовая кислота.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению группой животных Интакт;

* - по сравнению с группой животных Контроль;

\$ - сравнение показателей «до» и «после» иммунизации соответствующих групп.

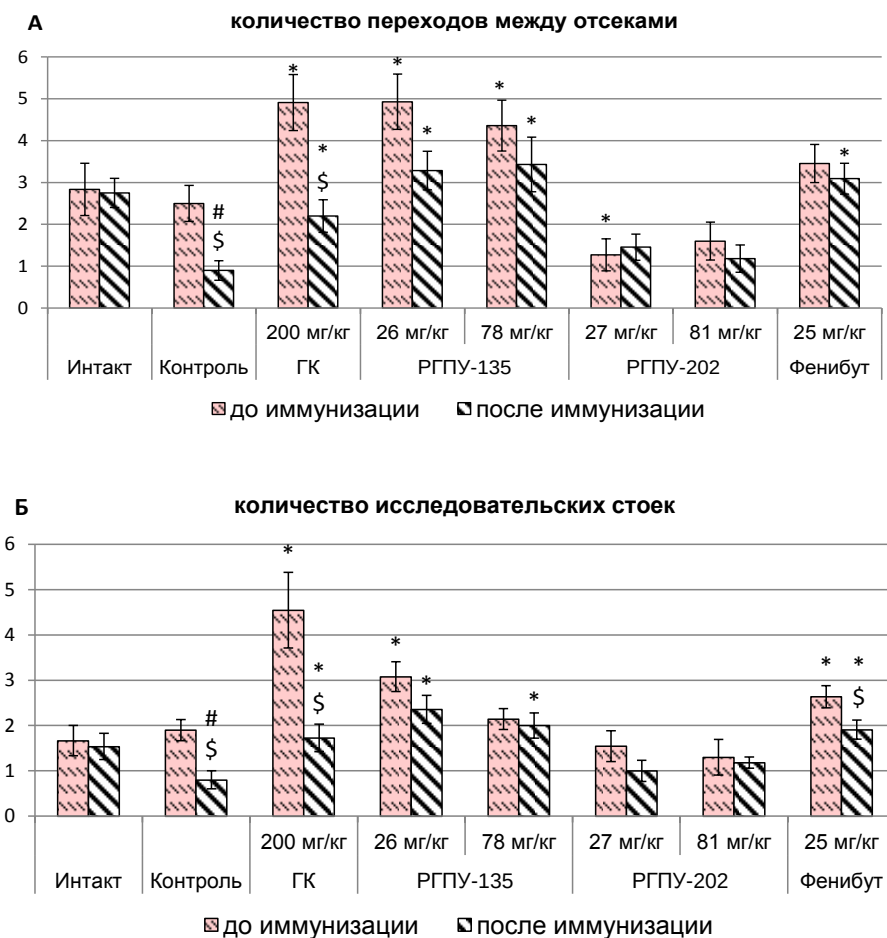


Рис. 5. Влияние исследуемых веществ на показатели активности поведения животных в тесте «Черно-белая камера» 1) после курсового введения (до иммунизации) и 2) на 3-ий день развития иммунного ответа на антигенный стимул (после иммунизации)

Таблица 6

Влияние исследуемых веществ на показатели, составляющие ориентировочно-исследовательскую активность животных в тесте «Открытое поле» ($M \pm m$)

Группы		Норки (количество)		Стойки пристеночные (количество)		Стойки свободные (количество)	
		до	после	до	после	до	после
Интакт		13,3±1,4	9,3±1,6	2,4±0,6	0,9±0,4	0,1±0,1	0,2±0,2
Контроль		11,3±1,2	3,3±0,4 #	2,1±0,9	0,3±0,2	0,2±0,1	0±0
ГК 200 мг/кг		4,5±0,8 *	1,6±0,6 *\$	13,5±0,9 *	7,6±1,1 *\$	3,8±0,8 *	0,7±0,5 \$
Нейро- глутам	26 мг/кг	12,5±0,7	10,9±1,6 *	6,3±1,2 *	2,4±0,7 *\$	0,6±0,3	0,1±0,1
	78 мг/кг	14,8±0,9 *	12,1±1,5 *	2,8±0,8	0,8±0,4 \$	0,3±0,1	0±0
РГПУ- 202	27 мг/кг	7,9±1,1 *	4,4±0,9 \$	0,4±0,3	0,4±0,3	0±0	0±0
	81 мг/кг	5,0±0,7 *	4,4±0,6	0,5±0,3	0,5±0,4	0,1±0,1	0±0
Фенибут 25 мг/кг		3,9±0,9 *	1,7±0,5 *\$	6,1±1,2 *	1,4±0,4 *\$	1,3±0,4 *	0,3±0,2 \$

Примечание: ГК – глутаминовая кислота, «до» - показатели снимали после курсового введения исследуемых веществ (до иммунизации животных); «после» - показатели снимали на 3-ий день развития иммунного ответа на антигенный стимул (после иммунизации животных).

*Различия достоверны при $p \leq 0,05$: # - по сравнению группой животных Интакт; * - по сравнению с группой животных Контроль; \$ - сравнение показателей «до» и «после» иммунизации соответствующих групп.*

локомоторной активности и незначительному повышению числа актов кратковременного груминга у животных, что может свидетельствовать об умеренном повышении тревожности на фоне активирующего действия данного вещества (Рис. 6А-Б).

В условиях развития иммунного ответа активирующее действие глутаминовой кислоты на поведение животных сохранялось, так в тесте «ОП» отмечались высокие показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активностей и было увеличено количество заходов в центр установки «ОП» ($p \leq 0,05$) (Рис. 4). При этом введение глутаминовой кислоты не влияло на вегетативные признаки тревожности – наблюдалось высокое число актов кратковременного груминга и количество фекальных болюсов (Рис. 6Б-В).

Также и в тесте «ЧБК» при применении глутаминовой кислоты у животных возрастало количество переходов между отсеками камеры и

количество исследовательских стоек относительно животных группы Контроль ($p \leq 0,05$) (Рис. 5), но при этом такие показатели тревожного состояния животных, как ЛП захода в темный отсек и суммарное время, проведенное в светлом отсеке оставались на уровне значений контрольной группы (Рис. 7).

При иммунизации животных антигеном наблюдалось седативное и анксиолитическое влияния соединения РГПУ-202 на поведение животных. Таким образом, наблюдалась низкая двигательная и ориентировочно-исследовательская активности животных в тесте «ОП» (Рис. 4). В «ЧБК» регистрировали малое количество переходов между отсеками и число исследовательских стоек, что было на уровне соответствующих значений животных группы Контроль (Рис. 5). В свою очередь, анксиолитические свойства у соединения РГПУ-202 в дозах 27 и 81 мг/кг проявлялись следующим образом: в «ОП» достоверно снижались вегетативные признаки тревоги – уменьшалось число актов кратковременного груминга и количество фекальных болюсов ($p \leq 0,05$) (Рис. 6Б-В), в тесте «ЧБК» был увеличен ЛП захода в темный отсек и зарегистрировано суммарное время, проведенное в светлом отсеке достоверно выше значений животных группы Контроль ($p \leq 0,05$) (Рис. 7).

Полученные нами результаты показывают, что при развитии иммунного ответа на антигенный стимул у животных происходит не только активация иммунной системы, направленная на борьбу с чужеродным агентом, но и изменения в психоэмоциональном статусе, которые выражаются в угнетении локомоторной и исследовательской составляющей поведения и в присоединении к нему тревожного компонента.

Исследуемые вещества в разной степени нивелировали угнетение поведения животных и их тревожность. Соединение РГПУ-202 в применяемых дозах оказывало значимый анксиолитический эффект и не улучшало показатели активностей поведения. Глутаминовая кислота напротив благоприятно влияла на показатели поведения и не оказывала

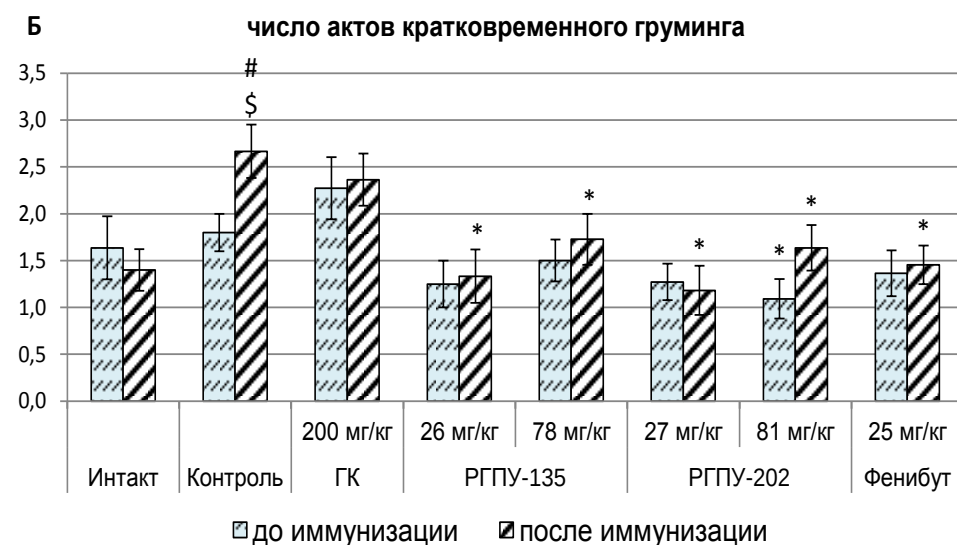
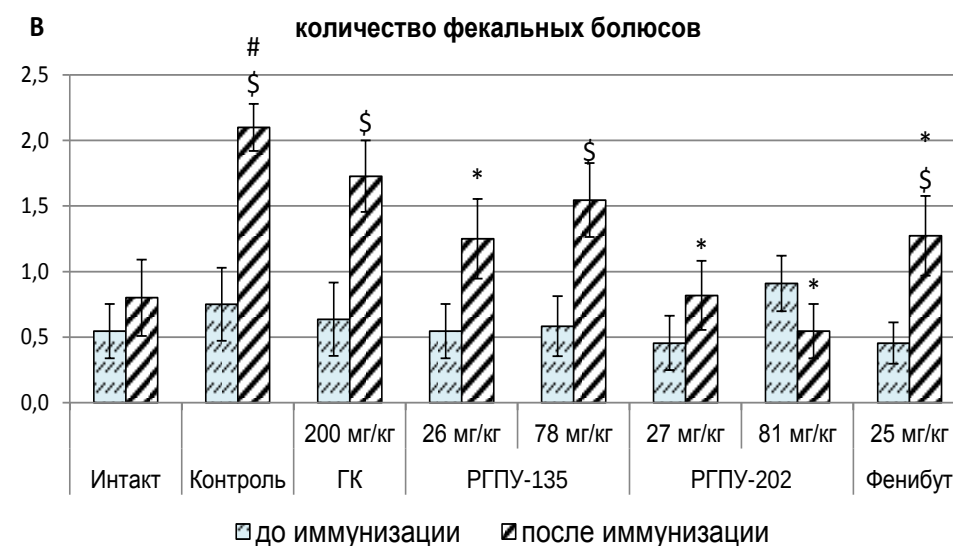
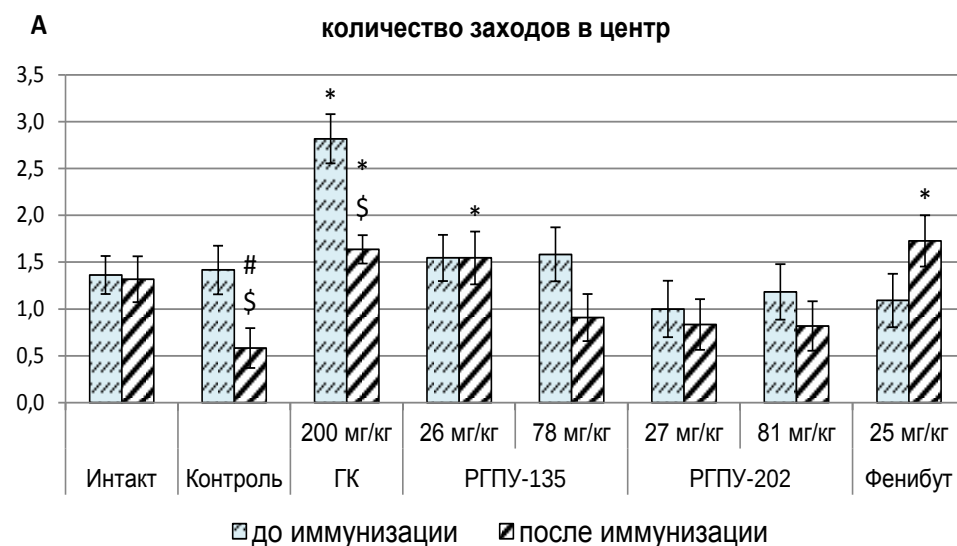


Рис. 6. Влияние исследуемых веществ на показатели тревоги животных в тесте «Открытое поле» после курсового введения (до иммунизации) и на 3-ий день развития иммунного ответа на антигенный стимул (после иммунизации)

Примечание: ГК – глутаминовая кислота.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению группой животных Интакт;

* - по сравнению с группой животных Контроль;

\$ - сравнение показателей «до» и «после» иммунизации соответствующих групп.

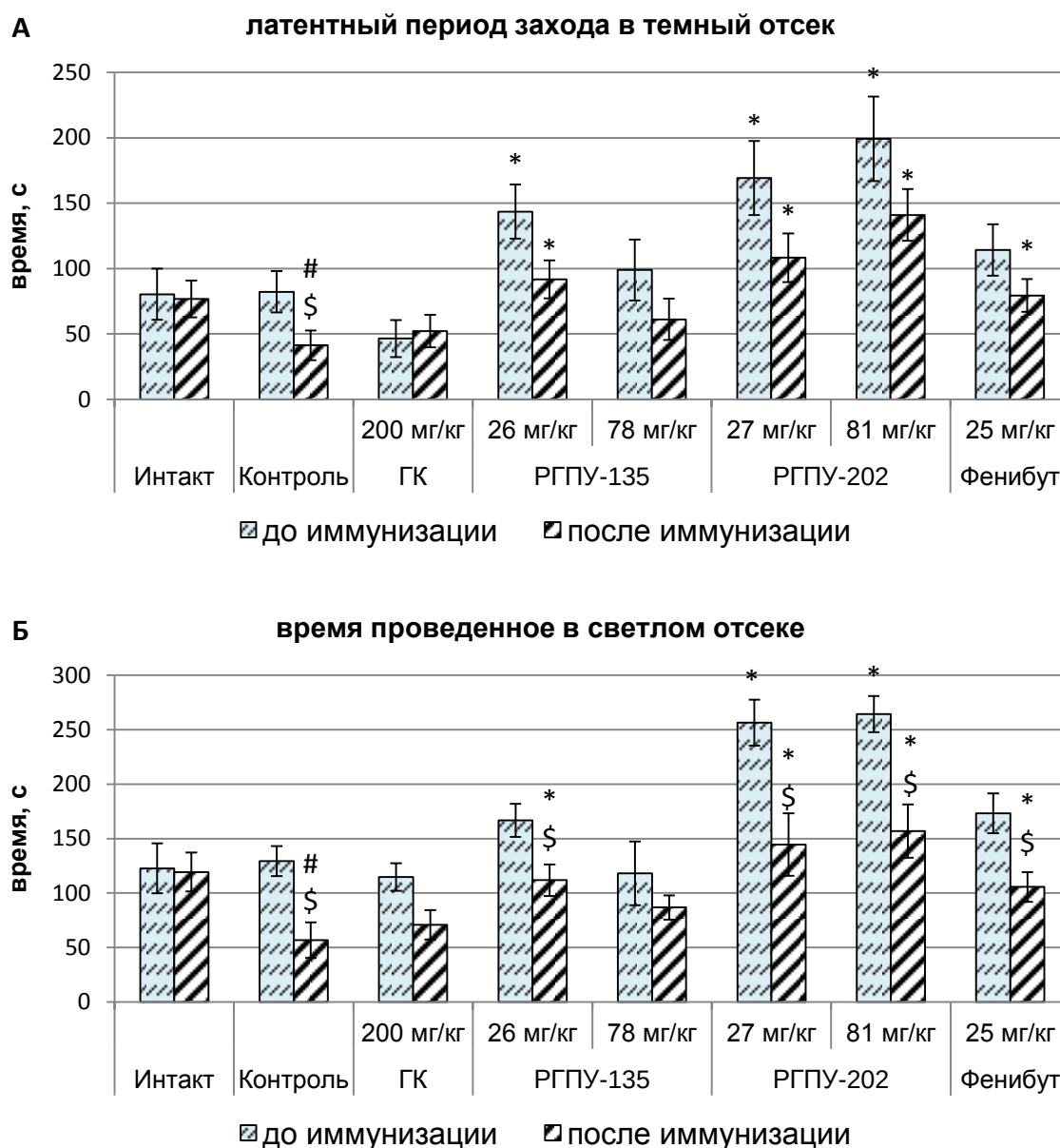


Рис. 7. Влияние исследуемых веществ на показатели тревоги животных в тесте «Черно-белая камера» после курсового введения (до иммунизации) и на 3-ий день развития иммунного ответа на антигенный стимул (после иммунизации)

Примечание: ГК – глутаминовая кислота.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению группой животных Интакт;

* - по сравнению с группой животных Контроль;

\$ - сравнение показателей «до» и «после» иммунизации соответствующих групп.

анксиолитического действия. Большое активирующее влияние на восстановление поведенческой составляющей животных в условиях развития иммунного ответа и выраженную анксиолитическую активность проявили нейроглютам в дозе 26 мг/кг и фенибут.

Заключение.

Таким образом, по результатам изучения иммуотропной и психотропной активности производных ГАМК и глутаминовой кислоты выявлены наиболее активные вещества, обладающие психоиммуномодулирующим действием: фенибут (25 мг/кг) и нейроглютам (26 мг/кг).

Фенибут оказывает выраженное стимулирующее влияние на гуморальное, клеточное звено первичного иммунного ответа на антиген как при однократном, так и при курсовом двухнедельном введении мышам линии Balb/c и увеличивает фагоцитарную активность нейтрофилов. Нейроглютам в дозе 26 мг/кг оказывает стимулирующее влияние на гуморальное звено иммунитета при однократном и курсовом применении, усиливает Т-клеточный иммунный ответ при однократном применении и, напротив, подавляет его при двухнедельном, увеличивает показатели фагоцитоза.

В условиях развития иммунного ответа на иммунизацию корпускулярным антигеном у животных наблюдаются изменения психоэмоционального статуса. Фенибут (25 мг/кг) и нейроглютам в дозе 26 мг/кг нивелируют признаки тревожности и угнетение локомоторной и исследовательской составляющей поведения у животных, что свидетельствует об их активирующем и анксиолитическом действии.

ГЛАВА 4. ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНИБУТА, НЕЙРОГЛУТАМА И ЦЕРЕБРОЛИЗИНА ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ.

В литературе отмечается сложность взаимодействия ГМ и ИС, влияние которой нельзя однозначно оценить как повреждающее или благоприятное при ишемическом поражении. Не только ГМ регулирует периферическую нервную систему, врожденный и приобретенный иммунитет после ишемического инсульта [191], но и клетки и медиаторы иммунного ответа также оказывают воздействие на нервную систему, проникая в ГМ, где они могут защищать ткани от повреждения, способствовать удалению некротических масс, принимать участие в процессах репарации ткани, помогать в восстановлении утраченных функций или наоборот усугублять повреждение и препятствовать восстановлению ткани [128].

В реальных условиях инсульт может произойти при нормальном, пониженном и повышенном иммунном статусе. Исходя из важной роли ИС, которая может сыграть адаптивную или дезадаптивную функцию при ОНМК, следует предположить, что течение и последствия ИГМ будут неодинаковыми у больных с различным состоянием ИС.

Так как на течение и исход инсульта влияют как патогенетические изменения со стороны нервной системы, так и иммунологически обусловленные факторы, подключающиеся в результате случившегося ишемического повреждения ткани [122, 123], то актуальным является необходимость учитывать при выборе противоинсультных препаратов возможные механизмы взаимодействия нервной и иммунной систем и соответственно принимать во внимание особенности действия нейропротекторных средств в условиях различного состояния иммунитета.

В связи с вышеизложенными фактами, при экспериментальном НМК представляется важным оценить терапевтический эффект веществ, имеющих влияние не только на нервную, но и на иммунную систему. Полученные нами

результаты (описаны в предыдущих главах) позволяют заключить, что фенибут и нейроглутам (соединение РГПУ-135), которые являются β -фенильными производными ГАМК и глутаминовой кислоты соответственно обладают иммуномодулирующими и нейропротекторными свойствами. Так как препарат церебролизин широко применяется в клинической практике и помимо нейротропной активности также обладает иммуностимулирующим влиянием, он был выбран нами в качестве препарата позитивного контроля [28, 52, 200].

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования явилось изучение влияния состояния ИС на последствия ишемического поражения ГМ у животных и церебропротекторного действия исследуемых веществ при ИГМ в условиях неизмененного и измененного состояния ИС животных. Эксперименты проводили по **Схеме 3А-Б** (см. Глава 2).

4.1. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на летальность животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Суммарные данные о динамике гибели животных после поэтапной окклюзии общих сонных артерий представлены в Таблице 7.

Через 7 суток после окклюзии ОСА в контрольной группе животных минимальная смертность наблюдалась на фоне стимулированной ИС – 40%, при этом у животных с подавленным иммунитетом этот показатель составил 75% что было достоверно выше, чем при иммуноактивации ($p \leq 0,05$). Уровень смертности у животных с неизменной ИС составил 55% (Таблица 7). Из представленных данных следует, что состояние ИС оказывает существенное влияние на выживаемость животных при ИГМ.

Во всех группах животных с церебральной ишемией, получавших в течение 7 дней терапию лекарственными веществами показатель смертности был меньше, чем у ишемизированных животных, получавших в качестве лечения физиологический раствор (Таблица 7). При этом у животных, получавших нейроглутам в качестве терапии инсульта, смертность была одинаково низкой – 20% при всех состояниях ИС. Также 20% умерших

Таблица 7

Летальность животных после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий (%)

Состояние ИС	Группы	N	Время после поэтапной окклюзии общих сонных артерий				
			12 часов	24 часа	48 часов	72 часа	7 суток
Неизменная иммунная система	ЛО	15	0	0	0	0	0
	ИГМ	20	20	25	30	35#	55#
	ИГМ+НГ	15	0	0 ∞	6,6 ∞	6,6 ∞	20 ∞
	ИГМ+ФТ	15	0	6,6 ∞	6,6 ∞	13,3 ∞	33,3
	ИГМ+ЦР	15	0	6,6 ∞	6,6 ∞	6,6 ∞	20 ∞
Подавленная иммунная система	ЛО	15	0	0	0	0	6,6
	ИГМ	20	20	30	40 #	50 #	75 #
	ИГМ+НГ	15	0	6,6 ∞	6,6 ∞	13,3 ∞	20 *
	ИГМ+ФТ	15	6,6	13,3	20 ∞	20 ∞	40
	ИГМ+ЦР	15	0	0 *	0 *	6,6 *	20 *
Стимулированная иммунная система	ЛО	15	0	0	0	0	0
	ИГМ	20	15	20	25	25 ^	40 #^
	ИГМ+НГ	15	0	0	13,3	13,3	20 ∞
	ИГМ+ФТ	15	0	6,6	6,6 ∞	6,6 ∞	20 ∞
	ИГМ+ЦР	15	0	13,3	20	26,6 +^	40 +^

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

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

*#, - по сравнению с ЛО группой животных; * - по сравнению с группой ИГМ (критерий Фишера).*

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

∞ - по сравнению с группой ИГМ; + - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой; ^- по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой (критерий хи-квадрат).

животных наблюдалось в группе с ИГМ, получавших фенибут на фоне стимулированного иммунитета. Однако применение данного препарата в условиях неизменной и подавленной ИС сопровождалось уже большей летальностью животных – 33% и 40% соответственно. Наименьшая

смертность при лечении ИГМ церебролизином составила 20% в условиях неизмененного и подавленного иммунитета против 55% и 75% соответственно в группе контрольных животных, получавших физиологический раствор. В то время как, при стимуляции ИС летальность животных при применении церебролизина не отличалось от контрольного значения и составила 40% (Таблица 7).

4.2. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на неврологический дефицит у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Изменения в иммунном статусе животных с церебральной ишемией приводили к развитию неврологического дефицита разной степени выраженности. Так в контрольной группе животных, получавших физиологический раствор в течение 7 дней после окклюзии ОСА в условиях стимулированной ИС наблюдались наименьшие неврологические отклонения ($5,28 \pm 0,89$), что было значимо ниже, чем у контрольных животных с подавленным иммунитетом ($p \leq 0,05$). Напротив, подавление ИС усугубляло течение ИГМ, что сопровождалось развитием тяжелого неврологического дефицита у выживших крыс ($8,1 \pm 0,76$), что также оказалось значимо выше, чем в аналогичной группе с неизменной ИС ($6,08 \pm 1,0$) ($p \leq 0,05$) (Таблица 8).

У животных, получавших после окклюзии ОСА в течение 7 дней исследуемые вещества, уровень неврологического дефицита был значительно меньше, чем у ишемизированных животных соответствующих серий, получавших физиологический раствор. При этом наилучший эффект наблюдался при применении нейроглутама, где неврологические нарушения при всех состояниях ИС были меньше (в среднем 2,22 балла), чем у контрольных животных ($p \leq 0,05$) и по абсолютным значениям баллы ниже, чем в группах животных, получавших терапию инсульта фенибутом. При применении фенибута после окклюзии ОСА на фоне стимулированного иммунитета регистрировали минимальный балл неврологического дефицита

у выживших крыс – $2,30 \pm 1,04$, что было значимо ниже, чем у контрольных животных ($p \leq 0,05$). Однако применение данного препарата в условиях неизменной и подавленной ИС сопровождалось уже большим неврологическим баллом от $3,83 \pm 1,17$ до $4,33 \pm 1,24$ соответственно и только при иммуносупрессии было значимо ниже контрольных значений ($p \leq 0,05$). У животных, получавших после окклюзии ОСА в течение 7 дней церебролизин, неврологический дефицит был наименьший в условиях неизменного и подавленного иммунитета от $2,07 \pm 1,06$ до $2,27 \pm 1,04$ балла соответственно. В то время как, применение церебролизина при иммуностимуляции сопровождалось развитием тяжелого неврологического дефицита у выживших крыс – $4,0 \pm 1,31$, что значимо не отличалось от балла группы контроль-ишемия (Таблица 8).

Таблица 8

Неврологический дефицит у животных по шкале McGrow после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий (баллы, $M \pm m$)

Состояние иммунной системы	Группы	Время после поэтапной окклюзии ОСА	
		72 часа	7 суток
Неизменная иммунная система	ЛО	$0,1 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,03$
	ИГМ	$4,65 \pm 0,91 \#$	$6,08 \pm 1,0 \#$
	ИГМ+НГ	$1,83 \pm 0,6 *$	$2,2 \pm 1,05 *$
	ИГМ+ФТ	$2,53 \pm 0,8$	$3,83 \pm 1,17$
	ИГМ+ЦР	$1,87 \pm 0,61 *$	$2,07 \pm 1,06 *$
Подавленная иммунная система	ЛО	$0,1 \pm 0,1$	$0,67 \pm 0,67$
	ИГМ	$6,68 \pm 0,77 \# +$	$8,1 \pm 0,76 \# +$
	ИГМ+НГ	$2,33 \pm 0,82 *$	$2,2 \pm 1,05 *$
	ИГМ+ФТ	$3,23 \pm 0,91 *$	$4,33 \pm 1,24 *$
	ИГМ+ЦР	$2,0 \pm 0,59 *$	$2,27 \pm 1,04 *$
Стимулированная иммунная система	ЛО	$0,07 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,05$
	ИГМ	$4,15 \pm 0,79 \# \wedge$	$5,28 \pm 0,89 \# \wedge$
	ИГМ+НГ	$1,97 \pm 0,85 *$	$2,27 \pm 1,04 *$
	ИГМ+ФТ	$1,73 \pm 0,62 *$	$2,3 \pm 1,04 *$
	ИГМ+ЦР	$3,47 \pm 1,07$	$4,00 \pm 1,31$

Примечание: ЛО – ложнооперированная группа животных; ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получавшая в качестве лечения физиологический раствор; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглутам, фенибут и церебролизин соответственно. Различия достоверны при $p \leq 0,05$:
- по сравнению с ЛО группой животных;

* - по сравнению с группой ИГМ;

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой.

4.3. Влияние фенибута, нейроголутама и церебролизина на координацию движений, мышечную силу и поведение животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

О степени ишемического повреждения ГМ, его функциональном состоянии после окклюзии ОСА можно судить по изменению координации движений, мышечной силы и поведения животных. Поэтому на 7-й день после моделирования ИГМ для оценки перечисленных параметров в тесте Rota-Rod фиксировали латентный период (ЛП) первого падения и суммарное время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки (указывают на координацию движений и мышечную силу). В тесте «Открытое поле» («ОП») регистрировали количество пересеченных квадратов и суммировали число заглядываний в отверстия и стоек (указывают на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активности).

В тестах Rota-Rod и «ОП» у животных групп контроль-ишемия с окклюзией ОСА независимо от состояния ИС наблюдались нарушение координации движений и снижение мышечной силы, более низкая двигательная и ориентировочно-исследовательская активности, чем у ЛО животных ($p \leq 0,05$). При этом наименьшие показатели из выше перечисленных в группе контроль-ишемия зафиксированы в условиях иммуносупрессии относительно значений, полученных при неизменной и стимулированной ИС ($p \leq 0,05$) (Рис. 8). В свою очередь, на фоне иммуноактивации у ишемизированных животных контрольной группы наблюдалось лучшая координация движений, большее суммарное время удержания на вращающемся стержне (Рис. 8А) и высокая двигательная активность (Рис. 8Б) по сравнению с аналогичной группой в условиях неизменной и подавленной ИС ($p \leq 0,05$).

Введение исследуемых веществ крысам в течение 7-ми дней после окклюзии ОСА оказало положительное влияние на изучаемые показатели в тестах Rota-Rod и «Открытое поле» ($p \leq 0,05$), но терапевтический эффект при применении фенибута и церебролизина отличался в зависимости от иммунореактивности животных. Тогда как применение нейроглутама способствовало сохранению у ишемизированных животных координации движений, мышечной силы, двигательной и исследовательской составляющей поведения на высоком уровне вне зависимости от фонового состояния ИС (Рис. 8).

Так, применение нейроглутама при неизменном и подавленном иммунитете значимо улучшало координацию движений и сохраняло большую мышечную силу в тесте Rota-Rod у животных, перенесших инсульт, в тесте «ОП» у ишемизированных животных отмечалась более высокая двигательная и ориентировочно-исследовательская активности, по сравнению с животными, которым вводили фенибут в аналогичных условиях эксперимента ($p \leq 0,05$). А при иммуноактивации и в тесте Rota-Rod и в тесте «ОП» у животных группы ИГМ+НГ все регистрируемые показатели были выше, чем при применении церебролизина ($p \leq 0,05$) (Рис. 8).

Введение при ИГМ в течение 7-ми дней фенибута показало, что при неизменной ИС в тесте Rota-Rod эффект при его применении был менее выражен, чем при введении нейроглутама и церебролизина ($p \leq 0,05$), а в тесте «ОП» он не оказывал достоверно значимого увеличения двигательной и ориентировочно-исследовательской активности ишемизированных животных по сравнению с контрольными значениями. Следует отметить, что координация движений и мышечная сила в тесте Rota-Rod у животных, получавших фенибут в условиях подавленного иммунитета, достоверно не отличалась от значений группы контроль-ишемия и ЛП первого падения был достоверно ниже, чем в аналогичной группе при неизменной ИС (Рис. 8А). На фоне подавленного иммунитета у животных группы ИГМ+ФТ наблюдалась меньшая двигательная и ориентировочно-исследовательская

активности в тесте «ОП», чем при применении нейроглутама и церебролизина ($p \leq 0,05$), а также двигательная активность животных была достоверно ниже, чем в аналогичной группе при неизменной ИС (Рис. 8Б). Более выраженное терапевтическое действие фенибут проявлял у животных со стимулированным иммунитетом, где показатели координации движений и мышечной силы в тесте Rota-Rod и показатели активностей в тесте «ОП» были достоверно выше, чем при применении церебролизина в тех же условиях эксперимента и выше аналогичных показателей групп ИГМ+ФТ на фоне неизменной и подавленной ИС ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что эффект фенибута при 7-ми дневном введении животным с ИГМ на фоне активации ИС был сопоставим с действием нейроглутама (Рис. 8).

При введении церебролизина на протяжении 7 дней после окклюзии ОСА у животных с неизменной и подавленной ИС координация движений и мышечная сила в тесте Rota-Rod, показатели двигательной активности и исследовательского поведения в тесте «ОП» были достоверно выше, чем у животных группы ИГМ+ЦР в условиях иммуноактивации ($p \leq 0,05$). При неизменном и подавленном иммунитете терапевтический эффект при применении церебролизина был соизмерим с действием нейроглутама при применении этих веществ в течение 7 дней для лечения ИГМ и превосходил таковой у фенибута ($p \leq 0,05$). А на фоне иммуноактивации организма, наоборот, состояние животных группы ИГМ+ЦР оцененное по показателям в тестах Rota-Rod и «ОП» было значимо хуже, чем при применении нейроглутама и фенибута ($p \leq 0,05$) (Рис. 8).

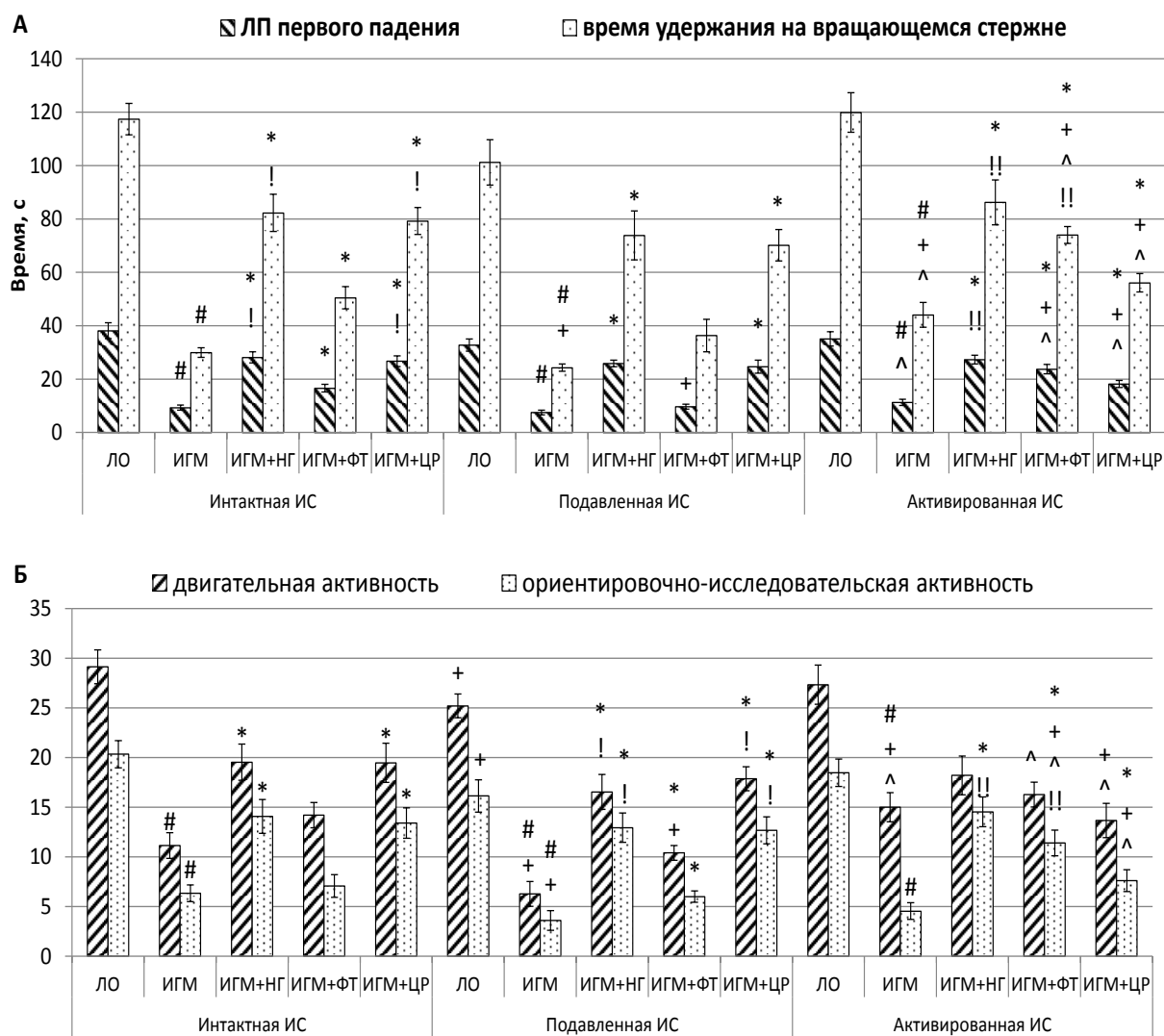


Рис. 8. Оценка А) координации движений и мышечной силы в тесте Rota-Rod Б) двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле» животных через 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий

Примечание: ИС – иммунная система; двигательная активность – количество пересеченных квадратов; ориентировочно-исследовательская активность – сумма стоек и заглядываний в отверстия; ЛП – латентный период первого падения; время удержания – суммарное время удержания на вращающемся стержне; ЛО – ложнооперированная группа животных; ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получавшая в качестве лечения физиологический раствор; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглутам, фенибут и церебролизин соответственно.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

** - по сравнению с группой животных ИГМ;*

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой;

! - между группами животных получавших нейроглутам и фенибут, церебролизин и фенибут;

!! - между группами животных получавших нейроглутам и церебролизин, фенибут и церебролизин.

4.4. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на уровень мозгового кровотока и процент гидратации ткани головного мозга после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Общая летальность животных после двусторонней перевязки ОСА и выраженность неврологического дефицита у выживших крыс в значительной степени зависят от кровоснабжения головного мозга. Таким образом, через 3 и 7 дней после окончательного моделирования ИГМ оценивали уровень мозгового кровотока (МК) в проекции средней мозговой артерии и степень гидратации мозговой ткани (Таблица 9).

Через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА уровень МК у животных в группах контроль-ишемия при всех состояниях ИС между собой отличался незначительно при небольшой тенденции к повышению в условиях иммуноактивации и был достоверно ниже МК у ЛО животных соответствующих серий в среднем на 43% ($p \leq 0,05$) (Таблица 9).

Через 3 и 7 дней лечения ИГМ нейроглутамом уровень МК при всех состояниях ИС был значимо выше, чем в группах контроль-ишемия соответствующих серий, и к 7-му дню наблюдалось его достоверное увеличение относительно показателей 3-х суток при неизменной и подавленной ИС ($p \leq 0,05$). Важно отметить, что при иммуносупрессии нейроглутам восстанавливал МК на 26% лучше по сравнению с фенибутом ($p \leq 0,05$) (Таблица 9).

В свою очередь, фенибут через 3 дня применения увеличивал данный показатель только при стимулированном иммунитете, а через 7 – и при стимулированной, и при подавленной ИС ($p \leq 0,05$). На фоне иммуноактивации МК в группах ИГМ+ФТ и ИГМ+НГ был сопоставим, но степень его прироста к 7-ым суткам была достоверно выше при применении фенибута ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что введение фенибута в течение 7 дней после окклюзии ОСА при стимуляции ИС животных способствовало восстановлению МК на 16% лучше по сравнению с церебролизином в аналогичных условиях эксперимента ($p \leq 0,05$) (Таблица 9).

Применение церебролизина в течение 3-х дней после окклюзии ОСА способствовало увеличению уровня МК относительно значений группы контроль-ишемия только в условиях неизменной и подавленной ИС, а через 7 дней при всех состояниях ИС ($p \leq 0,05$). Важно отметить, что при иммуносупрессии церебролизин восстанавливал МК на 25% лучше по сравнению с фенибутом ($p \leq 0,05$). Значимый прирост МК относительно показателей 3 дня наблюдался только при стимулированном иммунитете ($p \leq 0,05$). Однако, через 7 суток лечения ИГМ объем МК у животных, получавших церебролизин на фоне иммуноактивации, был немного ниже, чем у животных, которым вводили нейроглютам и значимо меньше, чем при применении фенибута ($p \leq 0,05$) (Таблица 9).

Таким образом, при иммуносупрессии статистически значимо лучше МК восстанавливали лекарственные вещества нейроглютам и церебролизин по сравнению с фенибутом ($p \leq 0,05$). В свою очередь на фоне стимулированной ИС применение фенибута способствовало значимо большему МК, чем введение церебролизина ($p \leq 0,05$). При неизменной ИС применение в течение 7 дней после окклюзии ОСА нейроглутама и церебролизина приводило к регистрации МК одинакового уровня.

Известно, что при ИГМ всегда имеет место воспалительная реакция, эндотелиальная дисфункция и вследствие этого есть риск развития отека мозга и от его выраженности в значительной степени зависит исход инсульта. Поэтому в данном исследовании на 3 и 7 дни после окклюзии ОСА определяли степень гидратации мозговой ткани у животных с различным иммунным статусом и получавших при ишемии лекарственную терапию (Таблица 9).

Степень отека ГМ через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА в группах животных контроль-ишемия при всех состояниях ИС не отличалась между собой и была значимо выше групп ЛО животных соответствующих серий ($p \leq 0,05$) (Таблица 9).

Таблица 9

Уровень локального мозгового кровотока и процент гидратации мозговой ткани после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий (M±m)

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

Примечание: ЛО – ложнооперированная группа животных; ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получающая в качестве лечения физиологический раствор; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглутам, фенибут и церебролизин соответственно.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

* - по сравнению с группой ИГМ;

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой;

\$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных;

! - на 7 день лечения между группами животных получавших нейроглутам и фенибут, церебролизин и фенибут;

!! - на 7 день лечения между группами животных получавших фенибут и церебролизин.

При неизменной ИС отек ГМ как через 3, так и через 7 дней после окклюзии ОСА был достоверно меньше у животных, получавших в качестве лечения церебральной ишемии нейроглутам и церебролизин ($p \leq 0,05$). В свою

очередь, применение фенибута не оказывало значимого уменьшения отека в аналогичных условиях эксперимента (Таблица 9).

В условиях иммуносупрессии через 3 дня после окклюзии ОСА введение нейроглутама и церебролизина достоверно снижало отек ГМ, по сравнению с животными с ИГМ, получавшими физиологический раствор в качестве лечения, а к 7 дню аналогичный эффект наблюдался при введении всех исследуемых веществ ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что в группах ЛО, ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ и ИГМ+ЦР при подавленной ИС процент гидратации мозговой ткани через 7 дней после окклюзии ОСА был значимо ниже по сравнению с показателями аналогичных групп 3-х суток ($p \leq 0,05$) (Таблица 9).

При стимулированном иммунитете величина отека ГМ была ниже у животных при лечении НМК нейроглутамом и фенибутом в течение 7 дней ($p \leq 0,05$). При этом следует отметить, что на фоне иммуноактивации фенибут снижал процент гидратации ткани ГМ значимо лучше, чем у животных аналогичной группы с неизменной ИС, а применение церебролизина приводило к развитию большего отека по сравнению с группой ИГМ+ЦР в условиях иммуносупрессии ($p \leq 0,05$) (Таблица 9).

Таким образом, при экспериментальной ИГМ прослеживается взаимосвязь степени гидратации мозговой ткани, уровня мозгового кровотока и выраженностью неврологических нарушений у животных с ИГМ на фоне различного состояния ИС. Также отмечается неодинаковое нейропротекторное действие исследуемых веществ при неизменном, подавленном и стимулированном иммунитете, что очевидно следует учитывать в условиях оказания помощи больным с ОНМК.

4.5. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на содержание нейронспецифических белков и нейротрофинов в сыворотке крови у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Наряду с клинической картиной, информативным для понимания истинной тяжести состояния и степени повреждения ГМ при различных патологиях является определение маркеров поражения нервной ткани -

нейронспецифических белков (НСБ), специфичных для нейронов и глии, так как увеличение их содержания в сыворотке крови и ликворе служит маркером выраженности повреждения клеток данной ткани [8, 83]. При тяжелых гипоксически-ишемических поражениях ЦНС развивается некроз клеток, при поражениях меньшей тяжести гибель клеток происходит по типу апоптоза [24]. К наиболее серьезным физиологическим ингибиторам запрограммированной гибели клеток относятся нейротрофические и ростовые факторы [98]. В основном с уменьшением апоптоза связывают нейропротективное действие фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и инсулиноподобных факторов роста [124].

В данной работе для оценки степени поражения ГМ после поэтапной двухсторонней окклюзии ОСА, для дополнительной верификации динамики и степени повреждения ГМ при его ишемии на фоне различного состояния иммунитета определяли уровень НСБ и нейротрофинов: NSE, MBP, BDNF и NGF в сыворотке крови крыс через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА.

4.5.1. Содержание нейронспецифических белков: нейронспецифической енолазы – NSE и основного белка миелина – MBP.

Для оценки степени поражения нервной ткани при ишемическом ее повреждении были определены уровни нейронспецифической енолазы (NSE) и основного белка миелина (MBP) как маркеров повреждения нейронов и глии ГМ.

При общем рассмотрении концентрации белков следует отметить, что уровни NSE и MBP на 3-ий день после окклюзии ОСА были примерно на одинаковом уровне во всех исследуемых группах, в том числе и у ЛО животных. Возможно, такое незначительное повышение белков у ЛО животных явилось результатом двойного оперативного вмешательства и действия общего наркоза на организм. Также следует отметить незначительное повышение данных маркеров на 3-ий день НМК у животных в условиях стимуляции иммунитета, что вполне объяснимо наличием в

период 3-х дней после ишемического повреждения ГМ местного воспаления и при общем активирующем действии липополисахарида мы имеем более напряженный воспалительных процесс (Рис. 9).

Концентрация белков NSE и MBP на 7-ые сутки после ишемического поражения ГМ была ниже по сравнению со значениями 3-го дня, за исключением групп животных с ИГМ, получавших в качестве лечения физиологический раствор на фоне неизменной и подавленной ИС, где повреждение нервной ткани прогрессировало. Следует отметить, что на 7-ой день после окклюзии ОСА у животных группы контроль-ишемия именно при иммуносупрессии наблюдались самые высокие концентрации NSE и MBP, что достоверно выше показателей, зарегистрированных в условиях стимулированного иммунитета ($p \leq 0,05$). В свою очередь, в группе контроль-ишемия на фоне иммуноактивации и у животных, получавших терапию исследуемыми веществами при всех состояниях ИС, прослеживалась положительная динамика восстановления ткани ГМ и глии после ишемического повреждения (Рис. 9).

NSE это гликолитический фермент, который локализуется главным образом в нейронах и нейроэндокринных клетках нервной системы, отражает метаболизм ЦНС и мембранные функции ГЭБ, является общим маркером всех дифференцированных нейронов [113]. NSE используется в качестве клинко-диагностического критерия в оценке поражения нейронов при ишемических и геморрагических инсультах [27, 96].

Через 3 дня после окклюзии ОСА при определении уровня NSE нами были получены данные показывающие, что при инсульте в группах контроль-ишемия уровень белка был выше по сравнению со значениями ЛО животных при всех состояниях ИС, но значимо только в случае стимулированного иммунитета ($p \leq 0,05$). Также у животных контрольной группы в условиях подавленной и стимулированной ИС уровень NSE был достоверно выше, чем при неизменном иммунитете ($p \leq 0,05$) (Рис. 9А). Через 7 дней после НМК у животных группы контроль-ишемия при

неизменном и подавленном иммунитете уровень NSE еще более увеличился, в то время как, на фоне стимуляции ИС концентрация белка снизилась практически в 2 раза по сравнению с показателем 3-х суток и была достоверно ниже значения аналогичной группы с иммуносупрессией ($p \leq 0,05$) (Рис. 9А).

Полученные результаты согласуются с клиническими проявлениями ишемии: данными по общей летальности животных, степенью неврологического дефицита, которые у животных со стимулированной ИС были значительно меньше, чем у животных с изначально неизменным иммунитетом и, особенно, по сравнению с животными с иммуносупрессией.

Через 3 дня после окклюзии ОСА на фоне неизменной ИС уровень NSE у животных, получавших исследуемые вещества, практически не отличался от такового в группе ишемизированных животных, получавших физиологический раствор в качестве лечения (Рис. 9А). Через 7 дней после окклюзии ОСА у животных, получавших нейроглютам и церебролизин при ИГМ, концентрация NSE снизилась относительно 3-го дня, а при введении фенибута уровень NSE в сыворотке крови не изменился. Однако, при применении всех исследуемых веществ в течение 7 дней после НМК концентрация NSE снизилась относительно значений группы контроль-ишемия, что свидетельствует о меньшем поражении нейронов при ИГМ ($p \leq 0,05$). Наименьший уровень енолазы наблюдался в группе ИГМ+НГ – 1,19 нг/мл, в группах ИГМ+ФТ и ИГМ+ЦР несколько больше – 1,72 и 1,64 нг/мл соответственно (Рис. 9А).

При иммуносупрессии на 3 день после окклюзии ОСА концентрация NSE у животных групп ИГМ+НГ и ИГМ+ЦР была ниже, чем у животных группы контроль-ишемия, а в группе ИГМ+ФТ – примерно одного уровня с контролем. Следует отметить, что через 3 дня лечения в группах ИГМ и ИГМ+ФТ уровень NSE у животных при подавленной ИС был достоверно выше, чем при неизменной ($p \leq 0,05$) (Рис. 9А). Дальнейшее введение исследуемых веществ при ИГМ привело к достоверному снижению

концентрации енолазы к 7-ым суткам терапии относительно контрольных значений ($p \leq 0,05$). Аналогично данным, полученным при неизменной ИС, при иммуносупрессии наименьший уровень NSE наблюдался в группе ИГМ+НГ – 1,47 нг/мл, а в группах ИГМ+ФТ и ИГМ+ЦР несколько больше – 2,16 и 1,88 нг/мл. При сравнении эффектов нейроглутама и фенибута на 7-ой день НМК в условиях подавленной ИС оказалось, что достоверно меньший уровень NSE наблюдался в группе ИГМ+НГ, чем при применении фенибута ($p \leq 0,05$) (Рис. 9А).

При стимуляции иммунитета уже на 3-ий день после окклюзии ОСА у животных при применении нейроглутама отмечено снижение белка относительно группы контроль-ишемия (2,06 против 4,17 нг/мл) ($p \leq 0,05$). Также незначительное содержание NSE отмечено у животных, получавших фенибут 3,29 нг/мл, а у животных, которым вводили церебролизин уровень NSE, напротив, превышал значения контрольной группы практически в 1,5 раза. На 3-ий день после НМК, в связи с ишемическим повреждением ГМ и нарушением целостности ГЭБ очевидно имеет место воспаление в нервной ткани. Существуют данные об иммуноактивирующем действии церебролизина и, возможно, это при искусственной стимуляции иммунитета усиливает воспалительную реакцию в ГМ, что может увеличить степень ишемического повреждения нейронов и вследствие этого повысить уровень NSE, как маркера их гибели (Рис. 9А). Через 7 дней после НМК в условиях стимулированной ИС достоверный эффект в снижении енолазы был получен при лечении ИГМ нейроглутамом и фенибутом ($p \leq 0,05$), при этом наименьшая концентрация NSE была достигнута у животных группы ИГМ+ФТ – 1,38 нг/мл, в группе ИГМ+НГ данного белка в крови было незначительно больше – 1,74 нг/мл. Хотя концентрация енолазы при введении церебролизина на 7-ой день ишемии снизилась более чем в 2,5 раза по сравнению с 3-ими сутками, ее содержание было одного уровня с контрольной группой, получавшей физиологический раствор – 2,53 нг/мл (Рис. 9А).

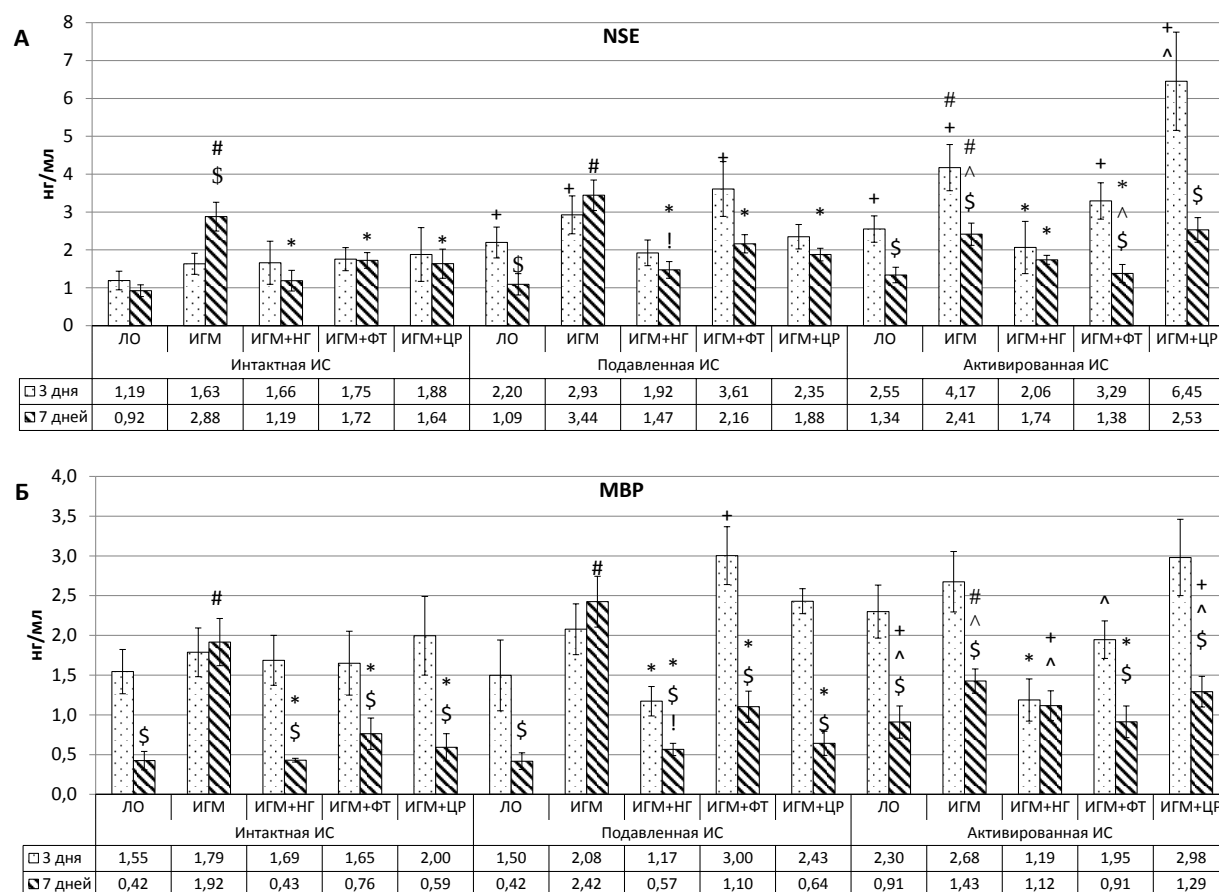


Рис. 9. Содержание А) NSE – нейронспецифической енолазы и Б) MBP – основного белка миелина в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий

Примечание: ИС – иммунная система; ЛО – ложнооперированная группа животных, ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получавшая в качестве лечения физиологический раствор; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглутам, фенибут и церебролизин соответственно.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

** - по сравнению с группой животных ИГМ;*

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой;

\$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных;

! - на 7 день лечения между группами животных получавших нейроглутам и фенибут.

MBP один из главных структурных, нейронспецифических белковых компонентов миелина, входящих в состав белого вещества ГМ. Нарушение его метаболизма чаще связывают с развитием демиелинизирующего процесса. Деструкция белого вещества мозга сопровождается выходом MBP из пораженной ткани [95, 96].

Через 3 дня после окклюзии ОСА у экспериментальных животных групп ЛО и контроль-ишемия уровень МВР был примерно одинаков при всех состояниях ИС (Рис. 9Б). Через 7 дней после НМК в группах ЛО животных уровень МВР значительно снизился, однако, на фоне активированной ИС был значимо выше, чем при неизменном и подавленном иммунитете ($p \leq 0,05$). Концентрация данного белка в группах контроль-ишемия была достоверно выше значений ЛО животных при всех состояниях ИС. Следует отметить, что максимально высокий уровень МВР наблюдался при ишемии на фоне иммуносупрессии, при этом белка было достоверно выше, чем в условиях иммуноактивации, где его концентрация была минимальной ($p \leq 0,05$) (Рис. 9Б).

Полученные результаты позволяют судить о меньшем повреждении глиальной ткани ГМ при ишемическом его повреждении на фоне стимулированного иммунитета и соотносятся со степенью повреждения дифференцированных нейронов по содержанию фермента NSE.

При неизменном иммунитете через 3 дня после окклюзии ОСА уровень МВР у всех экспериментальных групп был практически на одинаковом уровне (Рис. 9Б). К 7-му дню НМК у животных, получавших в качестве терапии ИГМ исследуемые вещества, концентрация основного белка миелина была достоверно ниже значений крыс контрольной группы и уровня 3-го дня в аналогичных группах ($p \leq 0,05$). Наименьшее содержание МВР наблюдалось в группе ИГМ+НГ – 0,43 нг/мл, в группах ИГМ+ФТ и ИГМ+ЦР несколько больше – 0,76 и 0,59 нг/мл соответственно (Рис. 9Б).

На фоне иммуносупрессии уже через 3 дня после НМК положительный эффект в снижении белка был достигнут в группе ИГМ+НГ, где уровень МВР составил 1,17 нг/мл, что было ниже показателя группы контроль-ишемия – 2,08 нг/мл ($p \leq 0,05$). При введении церебролизина концентрация МВР была практически одного значения с уровнем группы контроль-ишемия – 2,43 нг/мл, а у животных, получавших фенибут – выше значений контрольной группы – 3,00 нг/мл, что также было значимо больше уровня

MBP по сравнению с группой животных, получавших фенибут в условиях неизменной ИС (Рис. 9Б). Через 7 дней НМК в условиях иммуносупрессии применение всех исследуемых веществ достоверно снижало концентрацию MBP в крови по сравнению со значением у крыс группы контроль-ишемия и уровнем 3-го дня в аналогичных группах ($p \leq 0,05$). Максимальный эффект был достигнут при введении нейроглутама и церебролизина, где зарегистрировано минимальное содержание MBP – 0,57 и 0,64 нг/мл ($p \leq 0,05$). При применении нейроглутама концентрация основного белка миелина была достоверно меньше показателя животных группы ИГМ+ФТ, где концентрация MBP составила 1,10 нг/мл, что также в свою очередь было значимо меньше контрольных значений ($p \leq 0,05$) (Рис. 9Б).

В условиях стимулированного иммунитета на 3-ий день НМК при введении нейроглутама уменьшение концентрации MBP относительно контрольной группы было достоверным (1,19 против 2,68 нг/мл), а при применении фенибута незначительным – 1,95 нг/мл. Следует отметить, что в случае с фенибутом данный показатель был значимо ниже по сравнению со значением в аналогичной группе при подавленной ИС. В группе животных ИГМ+ЦР содержание MBP было одного уровня с группой контрольных животных, получавших физиологический раствор – 2,98 нг/мл (Рис. 9Б). На 7-ой день после окклюзии ОСА на фоне иммуноактивации концентрация основного белка миелина в группах контроль-ишемия и при введении исследуемых веществ значимо снизилась относительно значений 3-го дня ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что при применении нейроглутама и церебролизина в течение 7 дней после НМК на фоне активированного иммунитета концентрация MBP была выше по сравнению со значениями в аналогичных группах в условиях неизменной и подавленной ИС ($p \leq 0,05$). Наилучший эффект при иммуноактивации через 7 дней после НМК был достигнут у животных группы ИГМ+ФТ, где содержание MBP было минимальным – 0,91 нг/мл ($p \leq 0,05$), тогда как при применении нейроглутама и церебролизина – 1,12 и 1,29 нг/мл соответственно (Рис. 9Б).

4.5.2.Содержание нейротрофинов: фактора роста нервов – NGF и нейротрофического фактора головного мозга – BDNF.

Фактор роста нервов (NGF) и нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) являются основными нейротрофинами, которые имеют нейропротективное влияние в отношении нейронов и микроглии, стимулируют рост аксонов и ветвление дендритов, участвуют в неоангиогенезе у пациентов, перенесших ишемический инсульт, обладают антиапоптозной защитой [124]. Также существуют данные об участии нейротрофинов в антиоксидантной защите [190] и протективном влиянии, которое осуществляется за счет снижения провоспалительной реакции глии при различных видах нейронального повреждения [211].

На 3-ий день ишемического поражения ГМ имеет место нарушение целостности ГЭБ и процессы репарации только вступают в силу, тогда как к 7-му дню ишемии происходит частичное восстановление целостности и функции ГЭБ. Очевидно по этой причине на 3-ьи сутки сывороточная концентрация NGF и BDNF выше, чем на 7-ые. Снижение выхода NGF и BDNF в кровоток и повышение концентрации данного нейротрофического фактора в очаге поражения будет способствовать восстановлению поврежденной ткани (Рис. 10; Рис. 11).

Через 3 дня после окклюзии ОСА у животных с церебральной ишемией уровень NGF и BDNF был гораздо выше, чем у животных групп ЛО, при этом в случае NGF статистически значимо при всех фоновых состояниях ИС ($p \leq 0,05$) (Рис. 10), а в случае BDNF – только при неизменном и активированном иммунитете ($p \leq 0,05$) (Рис. 11). Эти данные свидетельствуют о том, что вследствие ишемического повреждения в ГМ выделяется большое количество фактора роста нервов и нейротрофического фактора головного мозга, которые при повреждении ГЭБ легко «вымываются» в кровеносное русло.

NGF. Через 3 дня после окклюзии ОСА в группах ЛО и контрольных животных максимальная концентрация NGF наблюдалось при

иммуностимуляции по сравнению со значениями в аналогичных группах в условиях неизмененного и подавленного иммунитета ($p \leq 0,05$) (Рис. 10). Очевидно, у животных со стимулированным иммунитетом, NGF оказывал трофическое действие на ишемизированную ткань ГМ, так как через 7 дней после НМК именно у животных с активированной ИС наблюдается благоприятный клинический исход в виде уменьшения общей летальности животных, а у выживших крыс наблюдается меньший неврологический дефицит, а также высокие показатели двигательной, ориентировочно-исследовательской активности и мышечной силы.

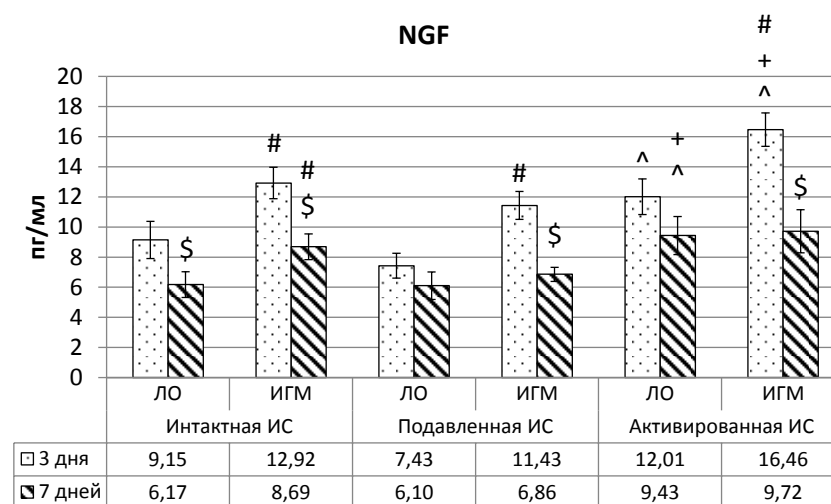


Рис. 10. Содержание NGF – фактора роста нервов в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий

Примечание: ЛО – ложнооперированная группа животных, ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получавшая в качестве лечения физиологический раствор.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой;

\$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных.

BDNF. Через 7 дней после окклюзии ОСА уровень BDNF у животных группы контроль-ишемия при неизмененном и стимулированном иммунитете значительно снижается относительно значений 3-го дня ($p \leq 0,05$) возможно вследствие частичного восстановления нормальной структуры и функции ГЭБ и уменьшения поступления белка в системный кровоток. Таким образом, BDNF концентрируется в ткани ГМ, где он и призван выполнять

нейротрофические функции. В свою очередь при иммуносупрессии к 7-му дню НМК у ишемизированных животных BDNF остался на достаточно высоком уровне. Такую высокую концентрацию белка возможно объяснить продолжающейся гибелью нейронов ГМ, распадом мозговой ткани, нарушением целостности ГЭБ и соответственно выходом фактора BDNF в системный кровоток (где его уровень был постоянно высок на протяжении 7 дней). Т.е. в данном случае BDNF очевидно не выполнял трофическую функцию и не способствовал дальнейшему восстановлению нейрональных структур, а проявлял себя как маркер постоянного и глубокого некроза клеток ткани мозга и повреждения ГЭБ при его ишемическом поражении. Такие выводы соотносятся с данными, свидетельствующими о большей гибели животных с иммуносупрессией на 7-ой день после окклюзии ОСА и более выраженном неврологическом дефиците у выживших особей в данной группе.

На фоне неизменной ИС животных через 3 дня после окклюзии ОСА концентрация BDNF при применении исследуемых веществ была ниже таковой, чем в группе ишемизированных животных, однако достоверно только в случае введения церебролизина ($p \leq 0,05$) (Рис. 11). Через 7 дней после НМК в условиях неизменного иммунитета уровень нейротрофического фактора во всех группах достоверно снизился по сравнению со значениями 3-го дня ($p \leq 0,05$) и при применении исследуемых веществ концентрация BDNF была значимо меньше, чем в группе контрольного ишемия ($p \leq 0,05$). Максимальное снижение содержания белка в кровотоке наблюдалось при применении церебролизина, где BDNF составил 234,0 пг/мл, в группах ИГМ+НГ и ИГМ+ФТ концентрация BDNF была 283 и 313 пг/мл соответственно (Рис. 11).

В условиях подавленного иммунитета через 3 дня после окклюзии ОСА концентрация BDNF была одинакового уровня в группах животных получавших лечение исследуемыми веществами и физиологическим раствором (Рис. 11). Через 7 дней после НМК у животных группы контрольного

ишемия на фоне иммуносупрессии концентрация BDNF незначительно снизилась по сравнению со значением 3-го дня и именно в этой группе животных уровень белка был максимально высокий по сравнению с аналогичными группами при неизменной и активированной ИС ($p \leq 0,05$). При 7-ми дневном применении всех исследуемых веществ после НМК концентрация BDNF значимо снизилась по сравнению с группой контроль-ишемия ($p \leq 0,05$). Максимально низкое значение BDNF наблюдалось в группе ИГМ+ЦР – 374 пг/мл, при применении нейроглутама и фенибута белка было несколько больше – 523 и 544 пг/мл соответственно. Следует отметить, что концентрация белка у животных с подавленным иммунитетом через 7 дней лечения в группах ИГМ+НГ и ИГМ+ФТ была выше значений аналогичных групп при неизменной ИС ($p \leq 0,05$) (Рис. 11).

При стимулировании ИС в группе животных, получавшей нейроглутам в качестве лечения ИГМ, уже через 3 дня после НМК наблюдалось достоверное снижение концентрации BDNF до уровня 505 пг/мл по сравнению с контрольным значением 1107 пг/мл ($p \leq 0,05$), что также было значимо ниже, чем в аналогичных группах в условиях неизменной и подавленной ИС ($p \leq 0,05$). При введении фенибута и церебролизина в данных условиях эксперимента уровень BDNF составил 908 и 1082 пг/мл, что практически не отличалось от контрольных значений (Рис. 11).

Через 7 дней после окклюзии ОСА при активированном иммунитете уровень BDNF во всех исследуемых группах был значимо ниже значений 3-го дня ($p \leq 0,05$). При этом в группе контроль-ишемия его концентрация составила 597 пг/мл, что было достоверно меньше значений аналогичной группы в условиях иммуносупрессии. При применении исследуемых веществ в течение 7 дней после НМК наблюдалось снижение концентрации BDNF по сравнению с группой ишемизированных животных, достоверное в группах ИГМ+НГ и ИГМ+ФТ, где уровень белка составил 387 и 390 пг/мл соответственно ($p \leq 0,05$) и незначимое при применении церебролизина до 404 пг/мл. Следует отметить, что концентрация BDNF при иммуноактивации в

группах ИГМ+ФТ и ИГМ+ЦР была значимо выше, чем в аналогичных группах при неизменной ИС ($p \leq 0,05$).

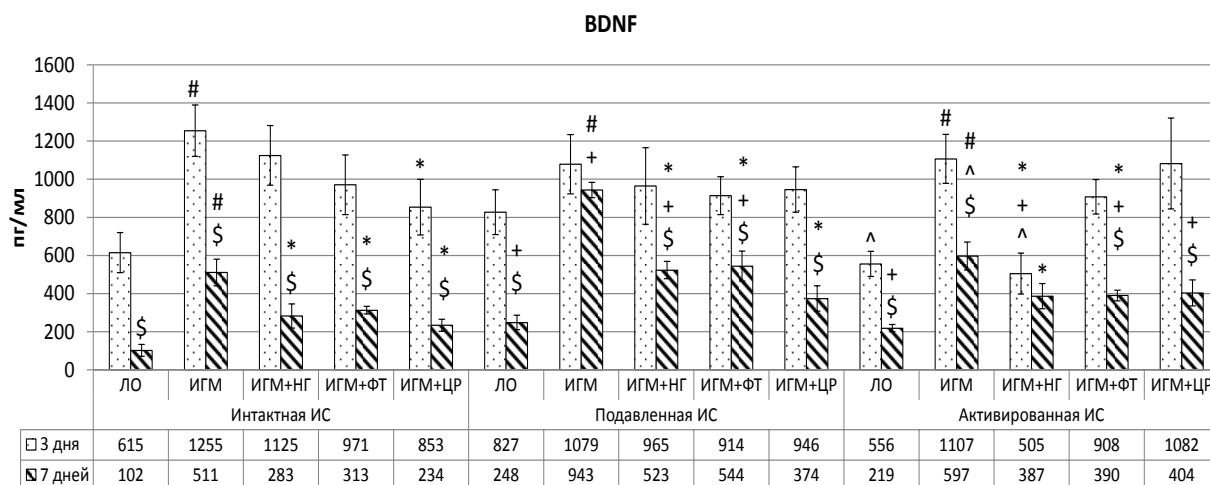


Рис. 11. Содержание BDNF – нейротрофического фактора головного мозга в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий

Примечание: ИС – иммунная система; ЛО – ложнооперированная группа животных, ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получавшая физиологический раствор в качестве лечения; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглутам, фенибут и церебролизин соответственно.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

** - по сравнению с группой животных ИГМ;*

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой;

\$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных.

Закключение.

Таким образом, недостаточность мозгового кровообращения, смоделированная на фоне иммуносупрессии, вызывает более выраженное поражение ЦНС, что проявляется в повышении общей летальности, степени выраженности неврологического дефицита, в большем угнетении двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных, нарушении у них координации движений и снижении мышечной силы, в повышении содержания NSE, MBP и BDNF, а также недостаточной секреции NGF.

Стимулирование ИС в тех же условиях эксперимента приводит к уменьшению количества летальных исходов, выраженности

неврологического дефицита выживших животных после ИГМ, у них отмечается большая двигательная активность, лучшая координация движений и мышечная сила, а также снижение уровня NSE, MBP и BDNF, повышение содержания нейротрофина NGF. Все это свидетельствует о меньшем ишемическом поражении ГМ у крыс со стимулированной ИС.

Полученные результаты позволяют говорить о значительном влиянии измененной иммунореактивности на патогенез, течение и клинический исход ОНМК, а также о возможной эффективности иммуномодулирующей терапии, направленной на уменьшение реакции локального воспаления, минимизацию аутоиммунной агрессии, снижение степени риска развития вторичных инфекций, что в результате позволит снизить летальность, степень инвалидизации и улучшить качество жизни пациентов.

Содержание маркеров повреждения дифференцированных нейронов – NSE и глиальных структур ГМ – MBP в сыворотки крови через 3 и 7 дней после моделирования НМК соотносятся между собой и с тяжестью ишемического повреждения ГМ и клиническим исходом.

Фенильные производные ГАМК – фенибут и глутаминовой кислоты – нейроглютам, а также препарат церебролизин оказали выраженное нейропротективное действие при НМК ишемического генеза как при неизменном иммунитете животных, так и на фоне измененной иммунореактивности. Однако, церебропротекция исследуемых веществ в значительной мере зависела от состояния ИС.

Таким образом, полученные данные общей летальности животных, суммарного балла неврологического дефицита, уровня мозгового кровотока, степени отека ткани ГМ, концентрации NSE, MBP и BDNF в системном кровотоке, показателей поведения животных, их координации движений и величины мышечной силы позволяют сделать вывод, что терапия ИГМ нейроглютамом дала одинаково положительный результат при всех состояниях ИС.

Фенибут оказывал наибольший нейропротективный эффект при НМК ишемического генеза на фоне активированной иммунной системы (следует отметить, что его терапевтическое действие было соизмеримо с применением нейроглутама) и хуже проявлял лечебные свойства при иммуносупрессии.

Церебропротективные свойства препарата церебролизин при ИГМ в большей степени проявились в условиях иммуносупрессии и на фоне неизмененного иммунитета, при этом при активации ИС его эффективность оказалась существенно ниже.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ФЕНИБУТА, НЕЙРОГЛУТАМА И ЦЕРЕБРОЛИЗИНА НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ.

Доказано, что в патогенезе ОНМК важную роль играют иммунные механизмы, но авторы расходятся во мнении относительно их влияния на течение заболевания и его исход [122, 149, 203]. Также, необходимо учитывать наличие тесной связи между механизмами повреждения и восстановления мозга после ишемии [78], которые проходят при непосредственном участии ИС.

Ведущая роль в развитии неврологического дефицита при ишемическом инсульте принадлежит провоспалительным цитокинам, что приводит к гибели нейронов и отеку мозговой ткани [34]. В.И. Скворцовой было показано, что провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-6, активно образующиеся в остром периоде инсульта индуцируют продукцию АКТГ и способствуют интенсивному выбросу глюкокортикостероидных гормонов. Эти изменения лежат в основе нарушений иммунного статуса больных и могут выступать в роли предикторов течения заболевания [34, 155].

Степень иммунных нарушений, во многом определяющая характер и исход инсульта, может быть частично откорректирована при назначении ряда базисных препаратов для лечения инсульта [34, 155]. Однако, более выраженный и максимально безопасный эффект может быть достигнут в результате использования препаратов для лечения инсульта, которые обладают, помимо нейротрофической активности, и иммунокорригирующим действием.

В проведенных нами исследованиях (описаны в предыдущих главах) фенильное производное ГАМК – фенибут (25 мг/кг) и фенильное производное глутаминовой кислоты – нейроглютам (26 мг/кг) обладают иммуномодулирующими свойствами. По данным многочисленных исследований, препарат церебролизин в дозе 2,5 мл/кг нормализует

нарушенный иммунный ответ у пациентов с различными неврологическими заболеваниями, сопровождающимися развитием иммунодефицита [52], поэтому он был выбран нами в качестве препарата позитивного контроля.

Учитывая важную роль иммунной системы в патогенезе ОНМК, важно исследовать влияние веществ на составляющие иммунитета, оценка которых позволит более объективно судить о состоянии иммунного статуса животных при церебральной ишемии. Эксперименты проводили по **Схеме 2А-Б** (см. Глава 2).

5.1. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на массу тимуса и селезенки у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Тимус, являясь центральным органом иммунной системы, принимает активное участие в поддержании гомеостаза организма. Известно, что основная функция тимуса – это антиген-зависимая пролиферация и дифференцировка Т-лимфоцитов. Наряду с этим появляется всё больше данных, свидетельствующих о более широких функциях тимуса, в частности – способности оказывать влияние на функционирование нервной и эндокринной систем [40, 166]. Комплексные взаимодействия тимуса, нервной и эндокринной систем являются неотъемлемой частью нормального гомеостатического баланса, лежащего в основе поддержания здоровья организма [105, 144]. Селезенка является периферическим органом иммунной системы и выполняет функцию депо крови в организме, данный орган быстро реагирует на стрессорное воздействие [130].

При ОНМК существует способность глюкокортикостероидов вызывать апоптоз лимфоцитов преимущественно в селезенке и тимусе, чем в лимфатических узлах, что является одной из причин изменения количества иммунокомпетентных клеток и возможной причиной Т-клеточного дефицита [42, 80, 169]. Масса, процентное соотношение клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла и в состоянии апоптоза, иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки может

свидетельствовать о напряженности компенсаторного ответа организма на стрессорное воздействие и нарушение гомеостаза [50].

Исходя из вышеперечисленного для оценки влияния исследуемых веществ на ИС животных при ишемическом поражении ГМ, нами были исследованы массы иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки животных через 3 и 7 дней после НМК в условиях неизмененного, подавленного и стимулированного иммунитета. По снижению относительной массы данных органов можно судить о качестве адаптационного ответа организма животного на нарушение гомеостаза.

Тимус. При рассмотрении динамики изменения массы тимуса через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА в группах животных с ИГМ, получавших физиологический раствор и исследуемые вещества в условиях неизмененного и подавленного иммунитета отмечается снижение данного показателя к 7-му дню, что свидетельствует о нарушении центральной регуляции органа и/или миграции иммунокомпетентных клеток в системный кровоток для участия в процессах воспаления и восстановления гомеостаза после сосудистой катастрофы. При стимулировании ИС, системное активирующее действие ЛПС, напротив, увеличивает массу тимуса к 7-му дню НМК, вероятно за счет активации дифференцировки пула Т-лимфоцитов к антигенным детерминантам ЛПС (Рис. 12А).

В условиях неизмененного иммунитета через 3 дня после окклюзии ОСА масса тимуса во всех исследуемых группах составила в среднем 0,39 – 0,46% относительно веса животных и не имела достоверных различий между собой (Рис. 12А). В группе контрольных животных, которым вводили физиологический раствор в условиях неизменной ИС на 7-ий день после окклюзии ОСА масса тимуса составила 0,20% что было значимо меньше, чем у ЛО животных (0,43%) и по сравнению с показателем 3-го дня ($p \leq 0,05$). Через 7 дней после окклюзии ОСА, у животных групп ИГМ+НГ и ИГМ+ФТ также наблюдалось значимое снижение массы тимуса относительно значений 3-го дня ($p \leq 0,05$), тогда как при применении церебролизина этого не

наблюдалось. Масса тимуса при введении в течение 7 дней после НМК нейроглутама и церебролизина на фоне неизмененного иммунитета была достоверно выше показателя группы контроль-ишемия – 0,27 и 0,38% против 0,20% соответственно ($p \leq 0,05$). Фенибут в аналогичных условиях эксперимента не приводил к увеличению тимуса относительно показателя контроля. Следует отметить, что применение церебролизина способствовало сохранению массы тимуса в 1,4 раза больше, чем нейроглутам ($p \leq 0,05$) (Рис. 12А).

В условиях подавленного иммунного ответа, циклоспорин может влиять на количество Т-лимфоцитов в тимусе за счет угнетения их антиген-зависимой пролиферации. При окклюзии ОСА в условиях подавленного иммунитета у животных группы контроль-ишемия через 3 дня после НМК масса тимуса практически не отличалась от значений группы ЛО – 0,21 против 0,23%, тогда как через 7 дней тимус составил 0,17% от массы тела крыс, что было уже значимо ниже значений группы ЛО (0,22%) и меньше массы 3-го дня в данной группе ($p \leq 0,05$). Таким образом, наименьшее процентное отношение массы тимуса к массе тела животных наблюдалось у ишемизированных животных при подавлении иммунитета, так как все зрелые иммунные клетки мигрировали в очаг поражения, а пролиферация и дифференцировка нового пула лимфоцитов была ингибирована действием циклоспорина (Рис. 12А). В условиях подавленной ИС животных через 3 дня после окклюзии ОСА применение нейроглутама и церебролизина приводило к сохранению большей массы тимуса, чем в контрольной группе крыс – 0,35 и 0,38% против 0,21% соответственно ($p \leq 0,05$). В группе ИГМ+ФТ на фоне иммуносупрессии через 3 дня после НМК масса тимуса составила 0,28%, что также было выше показателя контрольной группы (0,21%), но не достоверно. Следует отметить, что в группах ИГМ+НГ и ИГМ+ФТ масса тимуса была достоверно ниже значений аналогичных групп при неизмененном иммунитете ($p \leq 0,05$), тогда как при применении церебролизина снижение веса органа не наблюдалось. В условиях иммуносупрессии при введении

нейроглутама и церебролизина в течение 7 дней после окклюзии ОСА наблюдалась более высокая масса тимуса, чем в контрольной группе животных – 0,29 и 0,39% против 0,17% соответственно ($p \leq 0,05$), тогда как в группе ИГМ+ФТ данный показатель достоверно снизился относительно 3-го дня и был примерно одного значения с контрольной группой – 0,20% (Рис. 12А).

У животных с ИГМ в условиях стимуляции ИС через 3 дня после окклюзии ОСА тимус составил 0,32% от веса животного, что было достоверно выше значений группы ЛО (0,24%) и группы с ИГМ при подавленном иммунитете ($p \leq 0,05$). Через 7 дней у животных с ИГМ под влиянием ЛПС наблюдается достоверное увеличение массы тимуса до значений 0,50% от веса животного относительно 3-го дня, что также было значимо выше показателей групп животных с неизменным и подавленным иммунитетом ($p \leq 0,05$). Большая масса тимуса в данной группе свидетельствует о высоком уровне активности ИС, об отсутствии признаков истощения тимуса у животных после НМК и объясняется преобладанием системного активирующего действия ЛПС (Рис. 12А). В условиях стимуляции ИС животных через 3 и 7 дней после НМК масса тимуса в группах животных с ИГМ, получавших исследуемые вещества и физиологический раствор, значимо не различалась. Через 3 дня тимус весил в среднем 0,30-0,36%, через 7 дней – 0,38-0,50%. Следует отметить, что показатели массы тимуса через 7 дней после НМК в условиях стимуляции иммунитета животных во всех исследуемых группах были достоверно выше, чем в аналогичных группах в условиях неизменной и подавленной ИС ($p \leq 0,05$) (Рис. 12А).

Селезенка. При рассмотрении динамики изменения массы селезенки животных групп ЛО и контроль-ишемия через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА в условиях неизменного и подавленного иммунитета наблюдается достоверное снижение данного показателя к 7-му дню относительно 3-го ($p \leq 0,05$), которое было наиболее выраженным у животных с ИГМ. Это может

быть связано с возможным усилением апоптоза клеток селезенки вследствие нарушения нервной регуляции их функций и истощением клеточного пула (и иммунокомпетентных клеток и клеток красного ростка) в результате воспаления, которое развилось в ответ на повреждения тканей при инсульте.

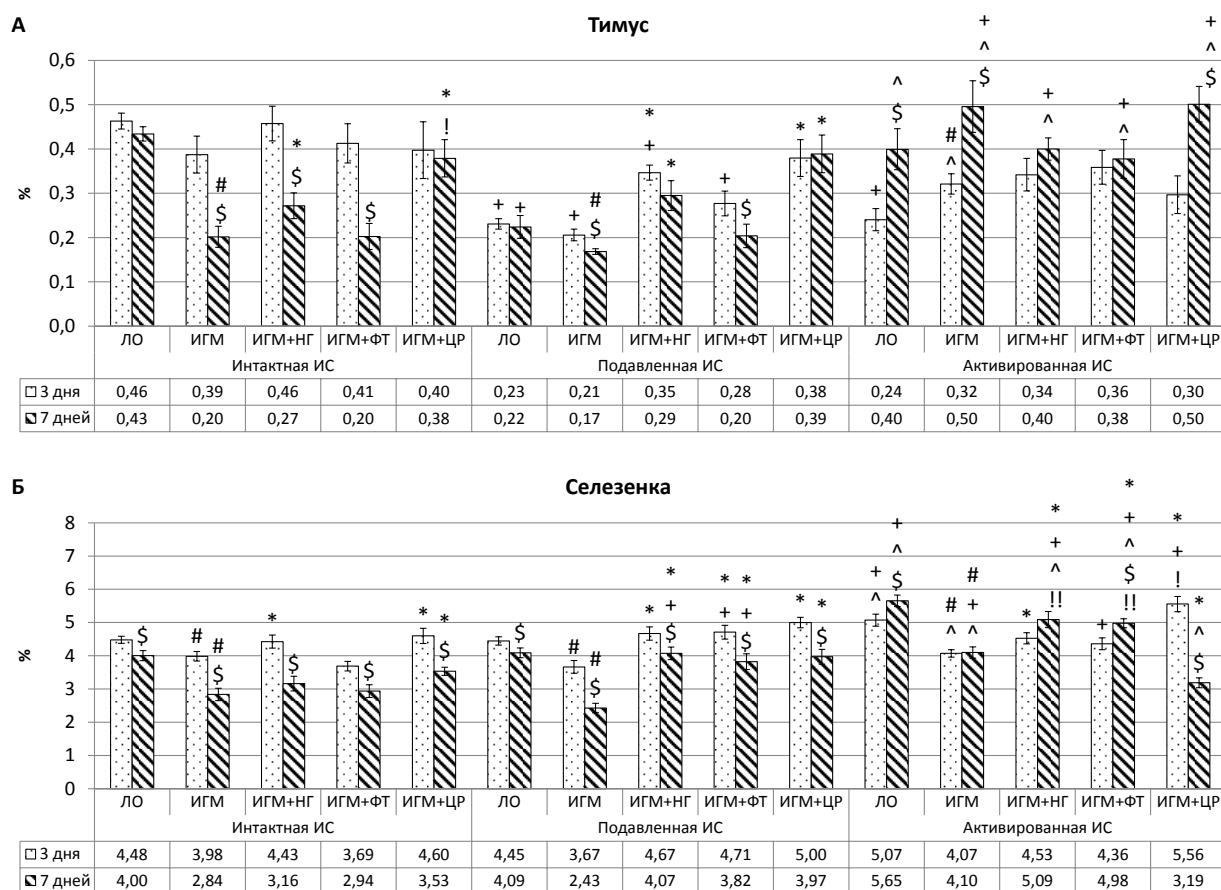


Рис. 12. Масса А) тимуса и Б) селезенки в процентном отношении к массе тела животного через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий

Примечание: ИС – иммунная система; ЛО – ложнооперированная группа животных, ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получающая в качестве лечения физиологический раствор; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглутам, фенибут и церебролизин соответственно.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

* - по сравнению с группой животных ИГМ;

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой;

\$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных;

! – на 3 и 7 день лечения между группами животных получавших нейроглутам и церебролизин.

!! – на 7 день лечения между группами животных получавших нейроглутам и церебролизин, фенибут и церебролизин.

При стимулировании ИС, действие ЛПС, напротив, поддерживает массу селезенки на высоком уровне, за счет системного активирующего влияния (Рис. 12Б).

В условиях неизмененного иммунитета через 3 и 7 дней после НМК масса селезенки у животных групп контроль-ишемия была значимо ниже значений ЛО крыс соответствующих серий и составила через 3 дня 3,98% против 4,48%, через 7 дней 2,84% против 4,00% (Рис. 12Б). При неизмененном иммунитете животных к сохранению высокой массы селезенки приводило применение в течение 3-х дней после окклюзии ОСА нейроглутама и церебролизина – 4,43 и 4,60 % соответственно против 3,98 % в группе контроля ($p \leq 0,05$). Через 7 дней течения НМК высокий показатель массы органа сохранился только в группе ИГМ+ЦР – 3,53 % против 2,84 у контрольных животных ($p \leq 0,05$). При введении животным с ИГМ фенибута масса селезенки через 3 дня после окклюзии ОСА составила 3,69 %, а через 7 дней – 2,94 %, что практически не отличалось от контрольных значений (Рис. 12Б).

В условиях иммуносупрессии в группах контроль-ишемия наблюдалось достоверное снижение массы селезенки животных относительно значений ЛО крыс, так через 3 дня при ИГМ масса органа составила 3,67 против 4,45% у ЛО, через 7 дней – 2,43 против 4,09%. Наименьшая масса селезенки наблюдалась в группе контроль-ишемия через 7 дней после НМК именно при иммуносупрессии, что говорит о большем истощении органа и недостаточной компенсаторной реакции организма (Рис. 12Б). При подавленной ИС применение всех исследуемых веществ способствовало сохранению высоких значений массы селезенки как через 3 дня, так и через 7 дней после НМК ($p \leq 0,05$). В группе ИГМ+НГ через 3 дня масса органа составила 4,67 %, через 7 дней – 4,07, в группе ИГМ+ ФТ – 4,71 и 3,82 %, у животных группы ИГМ+ЦР – 5,00 и 3,97 % соответственно (Рис. 12Б).

При стимуляции ИС у животных групп ЛО и контроль-ишемия как через 3, так и через 7 дней после окклюзии ОСА наблюдалась большая масса селезенки относительно аналогичных групп в условиях неизменного и подавленного иммунитета ($p \leq 0,05$). При ишемическом поражении ГМ наблюдалось снижение массы органа по сравнению с животными группы ЛО, так через 3 дня масса селезенки составила 4,07 против 5,07%, а через 7 дней 4,10 против 5,65% ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что при ИГМ масса селезенки в период наблюдения не подвергалась снижению к 7 дню ишемии и сохранялась на уровне от 4,07 до 4,10% от веса тела крыс (Рис. 12Б).

В условиях стимуляции иммунитета животных при ишемическом поражении ГМ, через 3 дня после НМК применение исследуемых веществ приводило к увеличению массы селезенки относительно значений контрольной группы. Масса органа составила 4,53% ($p \leq 0,05$), 4,36% и 5,56% ($p \leq 0,05$) в группах ИГМ+НГ+ФТ+ЦР соответственно против 4,07% у контрольных животных. Следует отметить, что масса селезенки при применении фенибута и церебролизина в данных условиях эксперимента была значимо выше, чем при неизменном иммунитете в аналогичных группах животных ($p \leq 0,05$). В группе ИГМ+ЦР в условиях иммуностимуляции наблюдалось увеличение массы селезенки через 3 дня после окклюзии ОСА превышающее в 1,2 раза данный показатель в группе ИГМ+НГ ($p \leq 0,05$). Масса селезенки через 7 дней после НМК на фоне активированной ИС при применении нейроглутама и фенибута составила 5,09 и 4,98%, что было значимо выше значений контрольной группы (4,10%) ($p \leq 0,05$) и больше по сравнению с показателями в аналогичных группах в условиях неизменного и подавленного иммунитета. Напротив, введение церебролизина в течение 7 дней после НМК не оказывало стабилизирующего влияния на массу селезенки, так как наблюдалось ее снижение относительно значений 3-го дня ($p \leq 0,05$). При этом масса селезенки составила 3,19% относительно веса животных, что было значимо меньше, чем в контрольной

группе животных (4,10%) ($p \leq 0,05$) и ниже, чем в аналогичной группе в условиях подавленного иммунитета ($p \leq 0,05$) (Рис. 12Б).

5.2. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на общее количество лейкоцитов и их субпопуляций в периферической крови у животных после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Также мы посчитали целесообразным изучить содержание общего количества лейкоцитов и их популяций при ОНМК с целью выявления у исследуемых веществ позитивного влияния на их количество при ИГМ.

У животных группы контроль-ишемия через 7 дней после окклюзии ОСА в группах с неизмененным и подавленным иммунитетом наблюдалось достоверное снижение общего количества лейкоцитов за счет субпопуляций лимфоцитов относительно групп ЛО животных соответствующих серий ($p \leq 0,05$). Так количество лейкоцитов и лимфоцитов составило 7,4 и $4,2 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно при неизменной ИС животных и 5,5 и $4,1 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно при подавленном иммунитете. На фоне стимуляции ИС животных через 7 дней после НМК у животных с ИГМ наблюдалось значимо большее содержание лейкоцитов и лимфоцитов по сравнению с аналогичной группой в условиях неизмененного и подавленного иммунитета ($p \leq 0,05$), так уровень лейкоцитов составил $15,9 \cdot 10^9/\text{л}$, а лимфоцитов – $10,1 \cdot 10^9/\text{л}$ (Таблица 10).

В условиях неизменной ИС введение нейроглутама, фенибута и церебролизина в течение 7 дней после НМК приводило к достоверному увеличению количества лейкоцитов до 12,5; 11,6 и $12,9 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно относительно группы животных, получавших лечение физиологическим раствором ($p \leq 0,05$). Вероятнее всего увеличение общего количества лейкоцитов происходило за счет популяции лимфоцитов, так как их значения в группах ИГМ+НГ+ФТ+ЦР к 7-му дню после окклюзии ОСА значимо выросли по сравнению с контрольными и составили 8,7; 8,3 и $8,4 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно ($p \leq 0,05$) (Таблица 10).

При ИГМ на фоне подавленного иммунитета применение всех исследуемых веществ приводило к увеличению уровня лейкоцитов относительно значения группы контроль-ишемия ($p \leq 0,05$), при этом наибольшее количество клеток было в группах ИГМ+НГ и ИГМ+ЦР – $11,3$ и $12,7 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно, вероятнее всего за счет нормализации лимфоцитарной популяции, так как лимфоциты в этих группах составили $6,2$ и $6,8 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно относительно контрольных значений ($p \leq 0,05$). В свою очередь, применение фенибута в данных условиях эксперимента значимо увеличивало содержание лейкоцитов до $9,5 \cdot 10^9/\text{л}$ относительно контроля, тогда как число лимфоцитов не отличалось от значения ишемизированной группы и составило $5,2 \cdot 10^9/\text{л}$, что было значимо меньше, чем в аналогичной группе при неизменной ИС ($p \leq 0,05$) (Таблица 10).

При стимулированном иммунитете в группах крыс ИГМ+НГ и ИГМ+ФТ наблюдалось снижение общего количества лейкоцитов относительно значения ишемизированных животных до $8,8$ и $8,3 \cdot 10^9/\text{л}$ ($p \leq 0,05$), тогда как в группе ИГМ+ЦР лейкоциты составили $12,2 \cdot 10^9/\text{л}$, что также было ниже, чем у контроля ($p \leq 0,05$). Количество лимфоцитов в группах животных, получавших нейроглутам и фенибут также значимо снизилось, относительно контрольных значений до $6,4$ и $5,9 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно ($p \leq 0,05$), а при применении церебролизина было примерно одного уровня с контрольными – $9,3 \cdot 10^9/\text{л}$ (Таблица 10).

Вероятнее всего, на фоне стимулированной ИС вещества нейроглутам и фенибут оказывали корректирующее действие на ИС, ограничивая чрезмерное увеличение лейкоцитов за счет субпопуляции лимфоцитов. Так как нарушение целостности ГЭБ само по себе может привести к развитию аутоиммунной агрессии к белкам нервной ткани, то и чрезмерная активация и увеличение иммунокомпетентных клеток может способствовать такому исходу. Таким образом, можно заключить, что корректирующее действие исследуемых веществ имеет положительное влияние и не допускает чрезмерной активации иммунитета у животных данных групп.

Таблица 10

Содержание лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в периферической крови через 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий ($M \pm m$, $10^9/\text{л}$)

Состояние иммунной системы	Группы	WBC	LYM	GRAN
Неизменная иммунная система	ЛО	12,4 $\pm$ 0,75	8,2 $\pm$ 1,10	4,1 $\pm$ 0,62
	ИГМ	7,4 $\pm$ 1,13 #	4,2 $\pm$ 0,83 #	3,1 $\pm$ 0,72
	ИГМ+НГ	12,5 $\pm$ 1,08 *	8,7 $\pm$ 1,40 *	3,6 $\pm$ 0,83
	ИГМ+ФТ	11,6 $\pm$ 1,43 *	8,3 $\pm$ 0,87 *	2,8 $\pm$ 0,88
	ИГМ+ЦР	12,9 $\pm$ 1,53 *	8,4 $\pm$ 0,99 *	4,3 $\pm$ 0,77
Подавленная иммунная система	ЛО	11,2 $\pm$ 0,88	9,0 $\pm$ 1,13	2,2 $\pm$ 0,47 +
	ИГМ	5,5 $\pm$ 1,19 #	4,1 $\pm$ 0,75 #	1,4 $\pm$ 0,17 +
	ИГМ+НГ	11,3 $\pm$ 1,72 *	6,2 $\pm$ 0,59 *	5,5 $\pm$ 0,94 *
	ИГМ+ФТ	9,5 $\pm$ 0,84 *	5,2 $\pm$ 0,69 +	4,3 $\pm$ 0,88 *
	ИГМ+ЦР	12,7 $\pm$ 1,80 *	6,8 $\pm$ 0,78 *	5,9 $\pm$ 0,77 *
Активированная иммунная система	ЛО	13,7 $\pm$ 1,48	9,9 $\pm$ 0,80	3,2 $\pm$ 0,45
	ИГМ	15,9 $\pm$ 0,73 +^	10,1 $\pm$ 0,85 +^	6,4 $\pm$ 0,73 ##^
	ИГМ+НГ	8,8 $\pm$ 0,78 *+	6,4 $\pm$ 0,91 *	1,8 $\pm$ 0,21 *+^
	ИГМ+ФТ	8,3 $\pm$ 0,64 *	5,9 $\pm$ 0,62 *+	2,2 $\pm$ 0,63 *
	ИГМ+ЦР	12,2 $\pm$ 0,99 *	9,3 $\pm$ 0,37 ^	2,5 $\pm$ 0,26 *^

Примечание: ЛО – ложнооперированная группа животных, ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получающая в качестве лечения физиологический раствор; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглутам, фенибут и церебролизин соответственно; WBC – общее количество лейкоцитов; LYM – абсолютное содержание лимфоцитов; GRAN – абсолютное содержание нейтрофилов (сегментоядерных) в периферической крови.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

** - по сравнению с группой животных ИГМ;*

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой.

5.3. Влияние фенибута, нейроглутама и церебролизина на уровни про- и противовоспалительных цитокинов - IL-1 β , IL-6 и IL-4 в сыворотке крови после необратимой окклюзии общих сонных артерий.

ОНМК сопровождаются воспалением тканей головного мозга, что в значительной мере сопряжено с включением в процесс цитокинового пула и, в частности, про- и противовоспалительных интерлейкинов, от соотношения

активности которых может зависеть течение и исход НМК [21, 63, 82, 222, 230].

Установлено, что провоспалительные цитокины вызывают и поддерживают в очаге ишемии воспалительную реакцию, что приводит к отсроченной гибели нейронов, тяжелому клиническому течению и неблагоприятному исходу заболевания. Противовоспалительные цитокины, напротив, подавляют экспрессию провоспалительных цитокинов, ограничивают воспаление и способствуют выживаемости нейронов, уменьшению зоны инфаркта, более благоприятному клиническому течению ишемического инсульта с тенденцией к восстановлению нарушенных функций [38, 42, 82, 189, 226].

Основными провоспалительными цитокинами являются IL-1 β , IL-6, TNF- α , которые активируются и синтезируются уже через час после ишемического инсульта и «заставляют» эндотелиальные клетки усиленно экспрессировать молекулы межклеточной адгезии, способствующих прилипанию лейкоцитов к стенке сосуда и миграции их в ишемизированную ткань мозга через ГЭБ [99, 153]. Местное высвобождение эндотелиальными клетками высокого содержания воспалительных цитокинов вызывает деградацию внеклеточного матрикса кровеносных сосудов, ведет к эндотелиальной дисфункции, и, соответственно, к повышению проницаемости ГЭБ в зонах нарушенной микроциркуляции, что приводит к увеличению объема очага поражения [63, 229].

Вместе с тем результаты экспериментальных исследований позволяют предположить, что прогрессирование повреждения зоны пенумбры может происходить не только под влиянием абсолютного увеличения концентрации провоспалительных цитокинов, но и вследствие недостатка противовоспалительных [39]. Основным из них является IL-4, который через механизм обратной связи ограничивает синтез провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IFN- γ , TNF- α) как клетками мозга, так и Т-лимфоцитами, активируя иммунокомпетентные клетки, способные к

продукции противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, IL-13), тем самым IL-4 выполняет защитную функцию, снижая степень ишемического повреждения [106, 235].

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

IL-1 β в остром и подостром периоде ОНМК отвечает за усиление воспалительного потенциала в поврежденной ткани, высокие его концентрации индуцируют нейрональную гибель. При неизменной и подавленной ИС животных после окклюзии ОСА в группе контроль-ишемия как через 3, так и через 7 дней наблюдался повышенный уровень IL-1 β , при стимулированном иммунитете - через 7 дней относительно ЛО животных. При этом в условиях иммуносупрессии к 7 дню ишемии уровень цитокина возрос до 14,28 пг/мл, что было значимо выше, значения у контрольных крыс при неизменной и стимулированной ИС ($p \leq 0,05$), что может свидетельствовать о активном воспалении в ГМ и находит свое отражение в повышенных концентрациях NSE и MBP у животных данной группы (Рис. 13А).

При неизменном иммунитете крыс через 3 дня после инсульта наблюдался значимо меньший уровень цитокина только при применении церебролизина, тогда как через 7 дней НМК все применяемые вещества приводили к его снижению относительно контрольных значений ($p \leq 0,05$) (Рис. 13А).

В условиях подавленной ИС при 3-х дневном применении нейроглутама после инсульта наблюдалось значимое снижение IL-1 β относительно группы контроль-ишемия, тогда как, при 7 дневном применении все исследуемые вещества приводили к достоверному снижению данного цитокина ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что в группе ИГМ+ФТ уровень IL-1 β значимо увеличился к 7 дню относительно 3 и был достоверно

выше по сравнению со значениями групп ИГМ+НГ и ИГМ+ЦР на 120% ($p \leq 0,05$) (Рис. 13А).

При системной активации ИС посредством липополисахарида через 3 дня после окклюзии ОСА уровень IL-1 β во всех экспериментальных группах был ниже, чем при неизменном и подавленном иммунитете ($p \leq 0,05$), а к 7 дню он значимо вырос относительно исходных значений ($p \leq 0,05$). Через 3 дня после ИГМ применение нейроглутама при стимулированном иммунитете достоверно снижало уровень цитокина относительно контроля ($p \leq 0,05$), через 7 дней такой эффект наблюдался не только в группе ИГМ+НГ, но и при введении фенибута ($p \leq 0,05$). Тогда как 7 дневное применение церебролизина, напротив, приводило к увеличению уровня цитокина до 14,76 пг/мл, что значимо превышало контрольные значения ($p \leq 0,05$) (Рис. 13А).

IL-6 рассматривается как маркер системного воспаления в организме, высокие его концентрации способствуют развитию дисфункции эндотелия, миграции иммунокомпетентных клеток в очаг повреждения. При окклюзии ОСА в группах контроль-ишемия при всех состояниях ИС наблюдалось большее содержание IL-6 в сыворотки крови, чем у ЛО крыс (Рис. 13Б).

В условиях неизменного иммунитета 3-х дневное введение всех исследуемых веществ достоверно снижало уровень IL-6 относительно группы контроль-ишемия ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что в группе ИГМ+ЦР концентрацию данного цитокина была на 32% ниже, чем при введении фенибута ($p \leq 0,05$). Через 7 дней после окклюзии ОСА при неизменной ИС крыс только нейроглутам и церебролизин способствовали снижению IL-6 относительно контрольных значений ($p \leq 0,05$) (Рис. 13Б).

При подавленном иммунитете у животных с ИГМ через 3 дня после перевязки ОСА содержание IL-6 было примерно одинаково во всех группах и отмечались более высокие его значения, чем в аналогичных группах при неизменной ИС. Через 7 дней после НМК при применении нейроглутама и церебролизина наблюдалось значимо меньшее содержание цитокина, чем в

группе контроль-ишемия ($p \leq 0,05$). При этом нейроглютам уменьшал содержание IL-6 на 36% сильнее, чем церебролизин ($p \leq 0,05$) (Рис. 13Б).

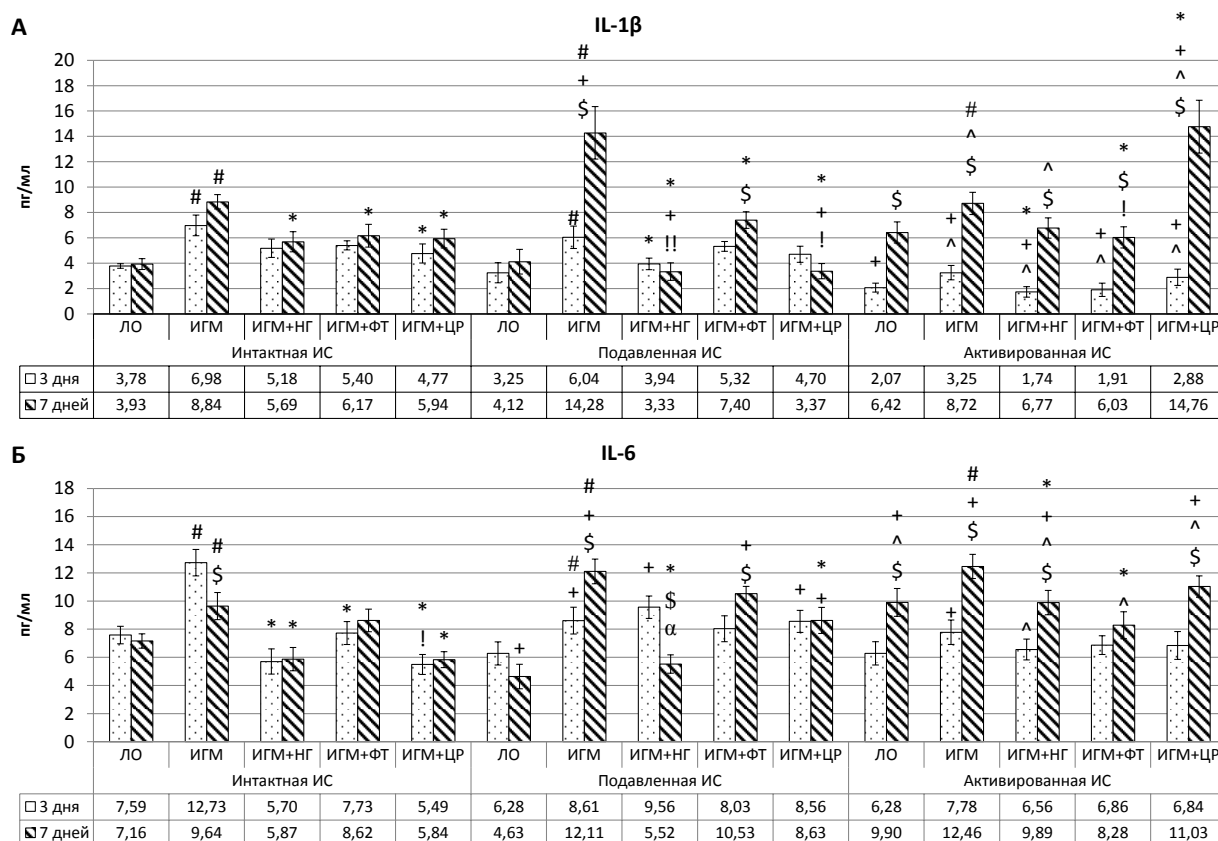


Рис. 13. Содержание интерлейкина А) IL-1 β и Б) IL-6 в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий

Примечание: ИС – иммунная система; ЛО – ложнооперированная группа животных, ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получающая раствор в качестве лечения физиологический; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглютам, фенибут и церебролизин соответственно.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

* - по сравнению с группой животных ИГМ;

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой;

\$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных;

! – на 3 и 7 день лечения между группами животных получавших фенибут и церебролизин;

!! - на 7 день лечения между группами животных получавших фенибут и нейроглютам.

α – на 7 день лечения между группами животных получавших нейроглютам и церебролизин.

В условиях стимулированного иммунитета через 3 дня после окклюзии ОСА содержание цитокина IL-6 у ЛО и ишемизированных животных не отличалось между группами. К 7 дню на фоне применения ЛПС уровень IL-6 во всех исследуемых группах значимо вырос и был достоверно выше, чем при неизменном и подавленном иммунитете ($p \leq 0,05$). Применение нейроглутама и фенибута способствовало значимому снижению концентрации цитокина по сравнению с группой контроль-ишемия ($p \leq 0,05$) (Рис. 13Б).

IL-4 относится к противовоспалительным цитокинам, вероятнее всего, большее содержание его на 1-3 сутки после ишемического повреждения будет носить благоприятное действие, ограничивая чрезмерное воспаление, а высокая его концентрация в более отдаленные сроки может носить компенсаторный характер, снижая провоспалительный потенциал по принципу отрицательно обратной связи (Рис. 14).

При неизменной ИС животных в группах ЛО и ишемизированных животных, получавших терапию исследуемыми веществами уровень IL-4 через 7 дней после окклюзии ОСА значимо снизился относительно значений 3-го дня ($p \leq 0,05$). В группах животных ИГМ+НГ и ИГМ+ЦР как через 3, так и через 7 дней после НМК наблюдалось значимо большее содержание IL-4 по сравнению со значениями группы контроль-ишемия ($p \leq 0,05$) (Рис. 14).

В условиях иммуносупрессии применение всех исследуемых веществ в течение 3 дней после окклюзии ОСА увеличивало содержание цитокина IL-4 в сыворотке крови ($p \leq 0,05$), к 7 дню данный эффект сохранялся только в группе ИГМ+НГ и ИГМ+ЦР ($p \leq 0,05$) относительно значений контрольной группы животных, получавшей физиологический раствор (Рис. 14).

При стимулировании ИС животных через 3 дня после окклюзии ОСА применение всех исследуемых веществ приводило к увеличению цитокина IL-4 по сравнению с контрольным значением ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что введение церебролизина увеличивало концентрацию IL-4 на 78 и 56% больше, чем нейроглютам и фенибут соответственно ($p \leq 0,05$). Вероятнее

всего, стимулирующее действие ЛПС и иммуностимулирующий эффект церебролизина носили аддитивный характер и индуцировали воспаление, что привело к компенсаторному увеличению противовоспалительного IL-4. Через 7 дней после окклюзии ОСА большее содержание IL-4 относительно контроля наблюдалось только в группе ИГМ+ФТ ($p \leq 0,05$) (Рис. 14).

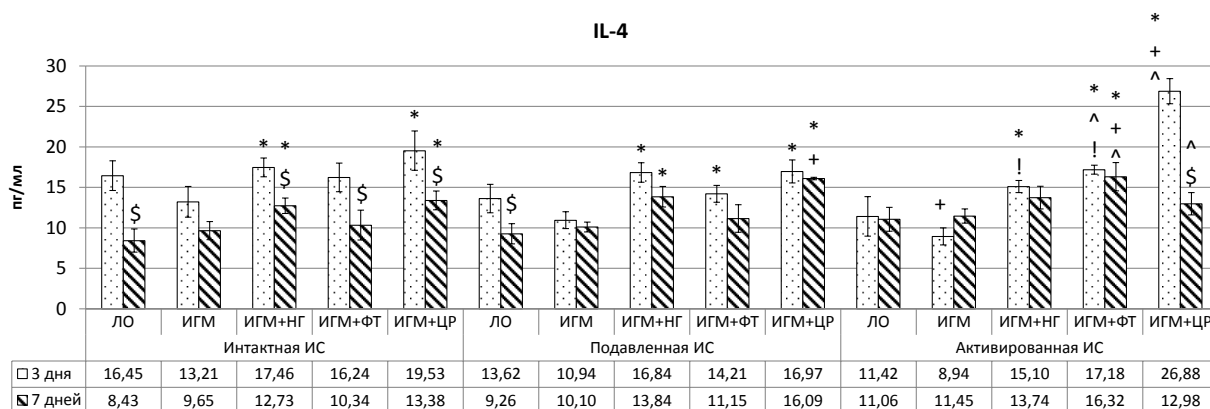


Рис. 14. Содержание интерлейкина IL-4 в сыворотке крови через 3 и 7 дней после поэтапной необратимой окклюзии общих сонных артерий

Примечание: ИС – иммунная система; ЛО – ложнооперированная группа животных, ИГМ – группа животных с ишемией головного мозга получавшая в качестве лечения физиологический раствор; ИГМ+НГ, ИГМ+ФТ, ИГМ+ЦР – группы животных с ишемией головного мозга получавшие в качестве лечения нейроглутам, фенибут и церебролизин соответственно.

Различия достоверны при $p \leq 0,05$:

- по сравнению с ЛО группой животных;

** - по сравнению с группой животных ИГМ;*

+ - по сравнению с аналогичной группой животных с неизменной иммунной системой;

^ - по сравнению с аналогичной группой животных с подавленной иммунной системой;

\$ - между 3 и 7 днем лечения в аналогичной группе животных;

! - на 3 день лечения между группами животных получавших нейроглутам и церебролизин и фенибут и церебролизин.

Заключение.

Таким образом, при оценке динамики изменения массы тимуса и селезенки отмечена их реакция на нарушения гомеостатического равновесия в организме по причине ишемического поражения ГМ. Нами получены данные показывающие, что наибольшее снижение массового содержания тимуса и селезенки у животных после окклюзии ОСА наблюдалось через 7 дней у животных с ИГМ на фоне подавленного иммунитета по сравнению с аналогичными показателями в условиях стимулированной ИС ($p \leq 0,05$), что

свидетельствует о большем истощении иммунокомпетентных органов и малом функциональном их резерве при иммуносупрессии.

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

При окклюзии ОСА в условиях неизменной и подавленной ИС ишемический инсульт протекает на фоне сниженного количества лейкоцитов и лимфоцитов, что вероятнее всего является неблагоприятным признаком иммуносупрессии, опосредованной инсультом. При стимулированной ИС, напротив, системное активирующее действие ЛПС приводило к значимому их увеличению относительно показателей ЛО животных.

Применение нейроглутама в течение 7 дней после окклюзии ОСА обладало корригирующим влиянием на содержание лейкоцитов и лимфоцитов при ИГМ в условиях неизменной и подавленной ИС, увеличивало их содержание в периферической крови, а при стимулированном иммунитете – снижало. В тоже время, фенибут регулировал данные показатели только при неизменной и стимулированной ИС, а церебролизин – при неизменной и подавленной.

Ишемическое поражение ГМ в условиях иммуносупрессии в группах животных, не получавших лечение исследуемыми веществами, протекает на фоне повышенного содержания IL-1 β и IL-6, причем уровень IL-1 β был выше, чем в аналогичной группе с неизменным и стимулированным иммунитетом, а содержание IL-6 больше, чем при неизменной ИС.

Нейроглутам и церебролизин в условиях неизменного и подавленного иммунитета животных способствовали уменьшению провоспалительного потенциала ИС за счет значимого снижения уровня IL-

1 β и IL-6 и увеличения содержания цитокина IL-4 в сыворотке крови крыс после ишемического инсульта. В условиях фоновой активации ИС применение нейроглутама и фенибута снижало уровень IL-1 β и IL-6 и повышало содержание IL-4 у крыс с ИГМ, тогда как при введении церебролизина через 3 дня после окклюзии ОСА наблюдалось максимальное содержание IL-4, а к 7 дню – высокий уровень IL-1 β .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе функционирования любого органа и системы лежат нейроиммуноэндокринные взаимодействия, которые обеспечивают сохранение гомеостаза, как в условиях нормы, так и при патологических состояниях [115]. Имеются многочисленные данные о том, что нарушения нормальных взаимодействий между этими системами способствуют возникновению ряда заболеваний или определяют характер их течения [3, 55]. Нервная и эндокринная системы модулируют функции иммунной системы с помощью нейротрансмиттеров, нейропептидов и гормонов, а иммунная система взаимодействует с нейроэндокринной системой с помощью цитокинов, а также других иммунопептидов и иммунотрансмиттеров [94, 156, 160].

Участие ГАМК- и глутаматергических механизмов описаны во многих нейроиммунных процессах [47, 75]. Так, рецепторы различных нейромедиаторов, в том числе и нейроаминокислот обнаружены на мембранах иммунокомпетентных клеток [55]. Еще в 1992 года группа ученых доказала, что лимфоциты в норме имеют глутаминовые рецепторы, подобные GluRs ЦНС [112]. В дальнейшем были обнаружены и охарактеризованы специфические глутаматсвязывающие участки, локализованные на внешней поверхности клеточной мембраны Т-лимфоцитов [47]. Многочисленные исследования свидетельствуют о прямом участии глутаминовой кислоты и глутаминовых рецепторов различных типов (GluRs) в функционировании эндокринной и иммунной систем [47, 137]. Наличие рецепторов нейроактивных кислот на клетках иммунной системы позволяет считать их не только нейро-, но и иммуномедиаторами [10].

Изменения иммунологической реактивности при различных патологических состояниях ЦНС имеет прикладное значение, что делает актуальным создание новых и поиск среди зарегистрированных средств препаратов, обладающих свойствами нейроиммунотензии [111, 126, 215].

В результате проведенных нами исследований, была установлена способность фенильного производного ГАМК – фенибута (25 мг/кг) стимулировать гуморальный, Т-клеточный иммунный ответ на корпускулярный антиген и увеличивать показатели фагоцитоза при однократном и курсовом двухнедельном применении. Полученные нами данные об иммуотропном действии фенибута, согласуются с ранее проведенными исследованиями М.А. Сомотруевой [75], в которых было доказано участие ряда производных ГАМК в иммунологических процессах на моделях иммунопатологий – циклофосфамидной иммунодепрессии и ЛПС-индуцированного стресса.

Соединение РГПУ-135 (нейроглютам), являющееся фенильным производным глутаминовой кислоты в дозах 26 и 78 мг/кг стимулировало гуморальный иммунный ответ как при однократном, так и при курсовом двухнедельном применении. Полученные данные согласуются с некоторыми литературными источниками, свидетельствующими о способности глутаминовой кислоты (и соответственно, могут объяснять наличие аналогичных эффектов у ее производных) стимулировать показатели гуморального иммунитета. Так в исследованиях А. Sali (1997) и С. Schuberg (2009) установлено, что глутаминовая кислота оказывает стимулирующее влияние на активность ИС, увеличивая количество антителообразующих и розеткообразующих клеток в селезенке у лабораторных животных с иммунодепрессией [198, 202].

При оценки действия нейроглутама на Т-клеточное звено иммунитета выявили неоднозначное его влияние. Так, при однократном введении нейроглутама в дозах 26 и 78 мг/кг увеличивал индекс РГЗТ, а при курсовом двухнедельном в дозе 26 мг/кг угнетал. Полученные данные свидетельствуют о способности производного глутаминовой кислоты при длительном применении подавлять реакции ИС, опосредованные Т-клеточным звеном, что согласуется с некоторыми литературными данными. Например, наблюдения клиницистов указывают, что хроническое действие повышенных

концентраций глутаминовой кислоты в плазме у здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями (в течение нескольких месяцев и лет) приводит к снижению числа лимфоцитов и их реактивности [182].

Нейроглютам при курсовом двухнедельном применении в дозах 26 и 78 мг/кг также увеличивал число активных нейтрофилов и количество поглощенных ими объектов фагоцитоза.

Так как антиген, попадая в организм, сам по себе является стрессорным агентом, не только изменяющим функциональное состояние клеток иммунной системы, но и вызывающий сложный комплекс нейроэндокринных сдвигов [20], таких как нарушение регулирования нейрональной активности посредством взаимодействия возбуждающих и тормозных нейромедиаторов, напряжение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси поддержания гомеостаза [49] и многое другое, то следующей целью настоящего исследования было выявить изменения в психоэмоциональном статусе животных в условиях развития иммунного ответа при иммунизации их корпускулярным антигеном и оценить психотропную активность производных ГАМК и глутаминовой кислоты при смоделированном состоянии.

Полученные нами результаты показывают, что при развитии иммунного ответа на антигенный стимул у животных происходит не только активация иммунной системы, направленная на борьбу с чужеродным агентом, но и изменения в психоэмоциональном статусе, которые выражаются в угнетении локомоторной и исследовательской составляющей поведения и в присоединении к нему тревожного компонента. Исследуемые вещества в разной степени нивелировали угнетение поведения животных и их тревожность. Большее активирующее влияние на восстановление поведенческой активности и устранение тревоги животных в условиях развития иммунного ответа проявили нейроглютам в дозе 26 мг/кг и фенибут в дозе 25 мг/кг.

Результаты оценки психотропной активности глутаминовой кислоты, ее новых производных – нейроглутама и соединения РГПУ-202, а также вещества фенибут согласуются с данными, полученными различными группами исследователей кафедры фармакологии и биофармации ФУВ. Таким образом, можно заключить о наличии активирующего эффекта у глутаминовой кислоты [87]; активирующего и анксиолитического действия у нейроглутама [36] выраженного больше в дозе 26 мг/кг и у вещества фенибут [48]; седативной и анксиолитической активности соединения РГПУ – 202 [60] наиболее выраженной в дозе 81 мг/кг.

Церебральный инсульт может вызвать дисфункцию ИС, проявляющуюся иммуносупрессией [123, 161]. В работах ряда авторов показано, что при ИГМ реагирует Т-клеточное звено иммунитета [241], что проявляется в значительном снижении количества лимфоцитов [71, 199, 208], выявлены изменения и в гуморальном звене иммунитета [81, 225, 226]. Также имеет место риск развития аутоиммунных реакций, что усугубляет клиническую картину и способствует развитию неврологического дефицита [35]. Определенное место в патогенезе ОНМК занимают неспецифические адаптивные реакции, развивающиеся за счет активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса - адаптационный синдром [77]. В частности они выражаются иммуносупрессией за счет ослабления Т-клеточного звена иммунитета [136].

Обосновано предположение о том, что в патогенезе ОНМК важную роль играют иммунные механизмы, но мнения относительно их влияния на течение заболевания и его исход противоречивы [122, 149, 203]. Также, необходимо учитывать наличие тесной связи между механизмами повреждения и восстановления мозга после ишемии [78, 128]. Ведущая роль в развитии неврологического дефицита при ишемическом инсульте принадлежит цитокинам, которые запускают каскад метаболических процессов приводящих к гибели нейронов и отеку мозговой ткани [34]. Таким образом, в литературе отмечается сложность взаимодействия

головного мозга и иммунной системы, поэтому ее влияние нельзя однозначно оценить как повреждающее или благоприятное при ишемическом поражении.

В реальных условиях инсульт может произойти при нормальном, пониженном и повышенном иммунном статусе. Исходя из важной роли ИС, которая может сыграть адаптивную или дезадаптивную функцию при ОНМК, следует предположить, что течение и последствия ИГМ будут неодинаковыми у больных с различным состоянием ИС.

Так как на течение и исход инсульта влияют как патогенетические изменения со стороны нервной системы, так и иммунологически обусловленные факторы, подключающиеся в результате случившегося ишемического повреждения ткани [122, 123], то актуальным является необходимость учитывать при выборе противоинсультных препаратов их возможное влияние на механизмы взаимодействия нервной и иммунной систем и соответственно принимать во внимание особенности действия нейропротекторных средств в условиях различного состояния иммунитета.

Степень иммунных нарушений, во многом определяющая характер и исход инсульта, может быть частично откорректирована при назначении препаратов для лечения инсульта, которые обладают, помимо нейротрофической активности, и иммунокорригирующим действием [34, 155].

В настоящее время существует широкий арсенал лекарственных препаратов, рекомендованных в терапии НМК, однако их эффективность в полной мере не удовлетворяет требованиям клиницистов. В доклинических исследованиях многие вещества оказываются высокоэффективными, но при клинических исследованиях они не проявляют той активности, которую регистрировали в эксперименте. Одной из возможных причин сложившейся ситуации может быть тот факт, что разработка новых лекарственных препаратов с нейропротекторными свойствами на этапах доклинических исследований зачастую происходит на условно здоровых животных, тем

самым полностью исключается влияние на состояние организма различных эндогенных/экзогенных факторов, которые в свою очередь предшествуют и способствуют развитию основного заболевания. Введение вещества животным с экспериментальной патологией, воспроизведенной на интактных (здоровых) животных, с сохраненными функциональными резервами сердечно-сосудистой системы, может дать более выраженный фармакологический эффект, чем у животных с имеющимися патологическими изменениями в органе и системе.

Установлено, что супрессия ИС, вызванная 13-ти дневным пероральным введением циклоспорина ежедневно в дозе 5 мг/кг, ухудшает течение ИГМ, что проявляется увеличением летальности до 75% (значимо выше, чем при стимулированной ИС, $p \leq 0,05$); более выраженным неврологическим дефицитом $8,1 \pm 0,76$ балла (значимо выше чем при неизменной и стимулированной ИС, $p \leq 0,05$); более высоким содержанием в сыворотке крови маркеров повреждения нервной ткани – нейронспецифической енолазы (NSE 3,44 нг/мл) и основного белка миелина (MBP 2,42 нг/мл), что статистически значимо выше, чем при стимулированной ИС ($p \leq 0,05$); снижением мышечной силы, нарушением координации движений, угнетением двигательной и ориентировочно-исследовательской активностей по сравнению с животными с ишемией мозга и неизменным и стимулированным иммунитетом ($p \leq 0,05$). У ишемизированных животных при подавленной ИС через 3 дня после ОСА также наблюдается меньшее содержание фактора роста нервов (NGF 11,43 пг/мл) по сравнению со стимулированным иммунитетом, но в тоже время через 7 дней после НМК высокое содержание нейротрофического фактора головного мозга (BDNF 943 пг/мл) по сравнению с неизменной и стимулированной ИС ($p \leq 0,05$).

Увеличение содержания NSE и MBP в сыворотке крови и ликворе по мнению ряда авторов может служить маркером выраженности повреждения клеток нервной ткани [8, 83]. Так зависимость уровня NSE от тяжести

поражения нейронов показана при ишемических и геморрагических инсультах [27, 83, 96]. У больных с НМК отмечено увеличение концентрации MBP в сыворотке крови, а также корреляция между уровнем белка и прогнозом инсульта [95, 96]. На основании представленного, высокие концентрации NSE и MBP, полученные в наших экспериментах можно интерпретировать большим поражением нервной ткани в условиях подавленной иммунной системы.

В свою очередь NGF и BDNF имеют нейропротективное влияние в отношении нейронов и микроглии, стимулируют рост аксонов и ветвление дендритов, участвуют в неоангиогенезе у пациентов, перенесших ишемический инсульт, обладают антиапоптозной защитой [124]. Также существуют данные об их участии в антиоксидантной защите [190] и протективном влиянии, которое осуществляется за счет снижения провоспалительной реакции глии при различных видах нейронального повреждения [211]. В группе ишемизированных животных с иммуносупрессией наблюдалось низкое содержание NGF в сыворотке крови, что привело к большему повреждению ГМ и через 7 дней высокие концентрации BDNF, вероятнее всего свидетельствуют о продолжающейся гибели нейронов и выходом данного фактора через поврежденный ГЭБ в системный кровоток.

ИГМ в условиях стимулированной ИС, вызванной 7-ми кратным внутрибрюшинным введением липополисахарида через день в дозе 10 мкг/кг, вызывала меньшую летальность крыс (40%). Через 7 дней после окклюзии ОСА у животных наблюдался меньший неврологический дефицит ($4,15 \pm 0,79$ балла); более высокое содержание фактора роста нервов (NGF 16.46 пг/мл) (на 44% выше через 3 дня после НМК); более низкие уровни NSE (2,41 нг/мл) и MBP (1,12 нг/мл) в сыворотке крови в среднем на 35%, более высокие показатели координации движений, мышечной силы и локомоторной активности в среднем на 90% по сравнению с животными с иммуносупрессией ($p \leq 0,05$).

По данным различных литературных источников [51, 122, 123, 136, 149, 161], а также основываясь на результатах нами проведенных исследований, мы отметили, что на развитие и исход патофизиологических процессов, вызванных ишемией головного мозга, значительное влияние оказывает состояние иммунной системы организма.

В связи с этим в данном исследовании была изучена нейропротекторная активность фенильных производных гамма-аминомасляной (фенибута) и глутаминовой кислот (нейроглутама), а также препарата церебролизин при моделировании ишемии головного мозга на фоне неизмененного, подавленного и стимулированного иммунитета животных. Исследуемые вещества вводились внутривентрикулярно соответственно в дозах 25 мг/кг, 26 мг/кг и 2,5 мл/кг в течение 7 дней после завершения моделирования ИГМ методом поэтапной перевязки общих сонных артерий с интервалом в 3-е суток.

Состояние иммунной системы оказывало значительное влияние на нейропротекторное действие исследуемых веществ при ИГМ.

Полученные данные общей летальности животных, суммарного балла неврологического дефицита, показателей поведения животных, концентрации NSE, MBP и BDNF и уровня мозгового кровотока позволяют сделать вывод, что терапия ИГМ нейроглутамом эффективна при всех состояниях ИС. В тоже время, терапевтический эффект при применении фенибута более выражен при активированном иммунитете, а нейропротекторное действие церебролизина при неизменной и подавленной ИС. Концентрация BDNF в группах животных, получавших терапию исследуемыми веществами в течение 7 дней после окклюзии ОСА при всех состояниях ИС была значимо меньше, чем у контрольных крыс. Вероятнее всего, при лечении гибель нейронов не прогрессировала и происходило частичное восстановление структуры и функции ГЭБ, поэтому BDNF не «вымывался» в системный кровоток.

Нейроглютам был эффективен как при неизменном иммунитете животных, так и на фоне измененной иммунореактивности. Возможным объяснением такого действия нейроглутама может быть наличие у него иммуномодулирующей активности. Летальность животных была минимальной (20%), неврологический дефицит легкой степени от 2,2 до 2,27 балла, показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, мышечной силы и координации движений поддерживались на высоком уровне при всех состояниях ИС. Однако, при иммуносупрессии он оказывал максимальный терапевтический эффект при ИГМ, достоверно повышая уровень мозгового кровотока на 56 %, снижая концентрацию NSE и MBP на 57 и 76 % соответственно через 7 дней лечения по сравнению с контрольной группой крыс.

Терапевтический потенциал фенибута был в большей степени выражен на фоне стимулированного иммунитета животных. Так, у животных, получавших фенибут в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней после окклюзии ОСА в условиях стимулированного иммунитета наблюдалась низкая смертность (20%), невысокий балл неврологического дефицита ($2,3 \pm 1,04$ балла), сохранялось большая двигательная активность, координация движений и мышечная сила, уровень мозгового кровотока был на 48% выше, а содержание в сыворотке крови NSE (1,38 нг/мл) и MBP (0,91 нг/мл) было значимо ниже относительно значений группы контроль-ишемия ($p \leq 0,05$).

с Малая эффективность церебролизина в условиях стимулированного иммунитета, возможно объяснима его иммуностимулирующими свойствами [28, 52, 200], которые, действуя синергично с системным активирующим действие ЛПС, могли привести к чрезмерной активации ИС после ишемического повреждения ГМ, что привело к формированию более тяжелой неврологической симптоматики.

Тимус является центральным органом иммуногенеза, от состояния и активности которого во многом зависит не только выраженность защитных реакций всего организма, но и адаптация организма к окружающей среде [37,

76]. Комплексные взаимодействия тимуса, нервной и эндокринной систем являются неотъемлемой частью нормального гомеостатического баланса, лежащего в основе поддержания здоровья организма [105, 144]. Селезенка является периферическим органом иммунной системы и выполняет функцию депо крови в организме [76], орган быстро реагирует на стрессорное воздействие – снижается количество клеток, в основном, за счет уменьшения В-лимфоцитов [130].

Коллективом авторов показано, что масса, процентное соотношение клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла и в состоянии апоптоза тимуса и селезенки может свидетельствовать о напряженности компенсаторного ответа организма на стрессорное воздействие и нарушение гомеостаза [50]. В работе Сергеевой С.П. в эксперименте на животных [81, 80] описано уменьшение индекса соотношения массы тимуса к массе тела крысы, уменьшение общего количества клеток на единице площади тимуса, активация этапов дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе (на фоне уменьшения количества клеток с картинами митоза), интенсивная эмиграция и деструкция тимоцитов у крыс в условиях ОНМК. Таким образом, полученные нами результаты об изменении массы тимуса и селезенки после окклюзии ОСА при моделировании ИГМ, соотносятся с литературными. При ИГМ наблюдалось снижение массы иммунокомпетентных органов в результате поэтапной перевязки ОСА, которое было наиболее выраженным в группе животных с ИГМ в условиях неизмененного и подавленного иммунитета через 7 дней после моделирования патологии. В то время как, в условиях стимуляции ИС массы тимуса и селезенки через 7 дней НМК статистически значимо превышали таковые при неизмененном и подавленном иммунитете ($p \leq 0,05$).

Одной из причин изменения количества иммунокомпетентных клеток при ОНМК может быть способность глюкокортикостероидов вызывать апоптоз лимфоцитов преимущественно в селезенке и тимусе, чем в лимфатических узлах, что является возможной причиной Т-клеточного

дефицита [42, 80, 169]. Нами получены результаты, что в периферической крови после ОНМК происходит снижение количества лимфоцитов. Так, ишемия головного мозга при неизменной и подавленной ИС животных протекает на фоне меньшего количества лейкоцитов и лимфоцитов, что вероятнее всего является неблагоприятным признаком иммуносупрессии, опосредованной инсультом.

Применение нейроглутама в течение 7 дней после окклюзии ОСА оказывало положительное влияние на массу тимуса и селезенки и содержание лимфоцитов при ИГМ в условиях интактной и измененной иммунореактивности, тогда как фенибут корректировал данный показатель только при неизменной и стимулированной ИС, а церебролизин – при неизменной и подавленной. Следует отметить, что на фоне стимулированной ИС вещества нейроглутам и фенибут оказывали корректирующее действие на ИС, ограничивая чрезмерное увеличение лейкоцитов за счет субпопуляции лимфоцитов. Так как нарушение целостности ГЭБ само по себе может привести к развитию аутоиммунной агрессии к белкам нервной ткани, то и чрезмерная активация и увеличение иммунокомпетентных клеток может способствовать такому исходу. Таким образом, можно заключить, что корректирующее действие исследуемых веществ имеет положительное влияние и не допускает чрезмерной активации иммунитета у животных данных групп.

Установлено, что провоспалительные цитокины вызывают и поддерживают в очаге ишемии воспалительную реакцию, что приводит к отсроченной гибели нейронов, тяжелому клиническому течению и неблагоприятному исходу заболевания. Противовоспалительные цитокины, напротив, подавляют экспрессию провоспалительных цитокинов, ограничивают воспаление и способствуют выживаемости нейронов, уменьшению зоны инфаркта, более благоприятному клиническому течению ишемического инсульта с тенденцией к восстановлению нарушенных функций [38, 42, 82, 189, 226].

Ишемическое поражение ГМ в условиях иммуносупрессии в группах животных, не получавших лечение исследуемыми веществами, протекает на фоне повышенного содержания IL-1 β и IL-6, причем уровень IL-1 β (14,28 пг/мл) был значимо выше, чем в аналогичной группе с неизменным и стимулированным иммунитетом ($p \leq 0,05$), а содержание IL-6 (12,11 пг/мл) больше, чем при неизменной ИС ($p \leq 0,05$). Такое высокое содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 вероятнее всего приводит к выраженной воспалительной реакции в тканях мозга после ишемического повреждения и процесс воспаления не переходит в репаративную фазу, поэтому в данной группе животных мы наблюдаем более выраженную неврологическую симптоматику. По литературным данным известно, что после артериальной окклюзии возрастает продукция макрофагами IL-1 β и IL-6, «заставляющих» эндотелиальные клетки усиленно экспрессировать молекулы межклеточной адгезии, способствующих прилипанию лейкоцитов к стенке сосуда и миграции их в ишемизированную ткань мозга [153]. В.И. Скворцовой было показано, что провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-6, активно образующиеся в остром периоде инсульта индуцируют продукцию АКТГ и способствуют интенсивному выбросу глюкокортикостероидных гормонов. Эти изменения лежат в основе нарушений иммунного статуса больных и могут выступать в роли предикторов течения заболевания [34, 155]. Стимулируя эндотелиоциты, моноциты и макрофаги, IL-1 β приводит к экспрессии тканевого фактора. При этом в циркуляции появляется тромбин, действие которого увеличивает адгезию мононуклеаров к эндотелию и повышает синтез ими IL-1, IL-6, что не только усиливает вазоспазм, миграцию лейкоцитов через гематоэнцефалический барьер, но и может способствовать развитию ДВС синдрома [45]. Более высокий уровень IL-6 в дебюте ишемического инсульта отражает выраженность эндотелиальной дисфункции и, соответственно, повышение проницаемости ГЭБ [63, 229], ведущей к увеличению объема очага поражения. Существуют сведения, что повышение уровня IL-6 после инсульта ассоциируется с повышенным

риском осложнений [118], а эндогенный антагонист IL-1 потенциально обладает нейропротективными свойствами, что уже показано в ходе нескольких исследований на животных [102]. В работах авторов показано, что высокое содержание IL-6 в остром периоде ОНМК коррелировало с размером инфаркта мозга [222], ранним неврологическим ухудшением, степенью тяжести ОНМК и его неблагоприятным течением [63, 189]. Таким образом, вещества снижающие уровень IL-1 и IL-6 могут увеличить вероятность благоприятного исхода ишемического инсульта.

Прогрессирование повреждения зоны пенумбры может происходить не только под влиянием абсолютного увеличения концентрации провоспалительных цитокинов, но и вследствие недостатка противовоспалительных цитокинов [39]. В экспериментальной модели инсульта доказано, что введение рекомбинантного человеческого IL-4 значительно сокращало объем инфаркта и снижало степень неврологического дефицита у мышей [235]. Данные результаты подтверждают ведущую роль IL-4 в процессах нейровоспаления. IL-4 через механизм обратной связи ограничивает синтез провоспалительных цитокинов, тем самым IL-4 выполняет защитную функцию, снижая степень ишемического повреждения [106, 235]. Исходно сниженное содержание защитных противовоспалительных факторов у больных с ишемическим инсультом характерно при наличии обширных очагов ишемического поражения ткани мозга [226, 169].

Нейроглютам и церебролизин в условиях неизмененного и подавленного иммунитета животных способствовали уменьшению провоспалительного потенциала ИС за счет значимого снижения уровня IL-1 β и IL-6 и увеличения содержания цитокина IL-4 в сыворотке крыс после ишемического инсульта. В условиях фоновой активации ИС применение нейроглутама и фенибута снижало уровень IL-1 β и IL-6 и повышало содержание IL-4 у крыс с ИГМ, тогда как при введении церебролизина через

3 дня после окклюзии ОСА наблюдалось максимальное содержание IL-4, а к 7 дню – высокий уровень IL-1 β .

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

крови NSE (соответственно на 16 и 30% выше) и MBP (на 21 и 41% выше), меньшее содержание NGF (на 13 и 44% меньше).

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

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

6. Церебролизин в дозе 2,5 мл/кг проявлял более выраженное нейропротекторное действие при ишемии головного мозга, протекающей в условиях неизменного и подавленного иммунитета. Так, его применение в течение 7 дней после окклюзии ОСА сопровождалось низкой смертностью животных (20%), невысоким баллом неврологического дефицита (2,2 балла), более высокими показателями поведения животных, увеличением уровня мозгового кровотока на 45%, снижением уровня NSE и MBP на 44 и 72% соответственно, по сравнению с контрольной группой крыс в условиях неизменного и подавленного иммунитета.

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

8. В условиях неизменной и подавленной иммунной системы нейроглютам и церебролизин относительно значений контрольных групп

снижали уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β на 34 и 76%, IL-6 на 39 и 41% соответственно, повышали содержание противовоспалительного IL-4 на 35 и 48% соответственно и увеличивали массу тимуса в 1,3-1,9 раз и 1,7-2,3 раза у крыс через 7 дней после окклюзии ОСА.

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

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АФК – активные формы кислорода

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

ГКК - глюкокортикоиды

ГМ – головной мозг

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИГМ – ишемия головного мозга

ИГМ+НГ – группа животных с ишемией головного мозга, получавшая нейроглютам

ИГМ+ФТ – группа животных с ишемией головного мозга, получавшая фенибут

ИГМ+ЦР – группа животных с ишемией головного мозга, получавшая церебролизин

ИИ – ишемический инсульт

ИПФР-1 – инсулиноподобный фактор роста-1

ИС – иммунная система

КА - катехоламины

ЛО – группа ложнооперированных животных

ЛП – латентный период

ЛПС – липополисахарид

МК – мозговой кровоток

НМК – нарушение мозгового кровообращения

НС – нервная система

НСБ – нейронспецифические белки

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

ОП – открытое поле

ОСА – общая сонная артерия

РГЗТ – реакция гиперчувствительности замедленного типа

РПГА – реакция пассивной гемагглютинации

ФЛА2 – фосфолипаза A2
ФФР-2 – фактор роста фибробластов-2
ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы
ЦНС – центральная нервная система
ЧБК – черно-белая камера
ЭБ – эритроциты бараны
BDNF – нейротрофический фактор головного мозга
DAMP молекулы – молекулы, ассоциированные с повреждением
IFN- γ – интерферон- γ
Ig A/M/G – иммуноглобулин A/M/G
IL-1 β /4/6/10/23 – интерлейкин 1 β /4/6/10/23
MBP – основной белок миелина
MHC I – молекула главного комплекса гистосовместимости
NGF – фактора роста нервов
NSE – нейронспецифическая енолаза
TGF- β – трансформирующий фактор роста- β
TLR – Толл-подобные рецепторы
TNF- α – фактор некроза опухоли- α

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов В.В. Основы нейроиммунологии: учеб. пособие / В.В. Абрамов, Т.Я. Абрамова, И.А. Гонтова и др. Новосибирск: Изд-во НГПУ, 2004. 264 с.
2. Абрамов В.В. Интеграция иммунной и нервной систем. Новосибирск: Наука, 1991. – 168 с.
3. Абрамов В.В. Возможные принципы интеграции иммунной и нейроэндокринной систем / В.В. Абрамов // Иммунология. – 1996. – № 1. – С. 60 – 61.
4. Амикишиева А.В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А.В. Амикишиева // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 529-542.
5. Арлыт А.В. Экспериментальное исследование церебропротекторной активности веществ синтетического и природного происхождения / А.В. Арлыт, М.Н. Ивашев, Г.В. Масликова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – Т. 17, № 4-1. – С. 95-98.
6. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Взаимосвязь психоэмоционального состояния и иммунной системы / Э.Б. Арушанян, Э.В. Бейер // Успехи физиологических наук. – 2004. – Т. 35, № 4. – С. 49-64.
7. Багметова В.В. Сравнительная оценка антидепрессивных свойств гидрохлорида β -фенилглутаминовой кислоты (РГПУ-135, глутарон) / В.В. Багметова, Ю.В. Чернышева, О.В. Меркушенкова и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 3. – С. 7-9.
8. Баканов М.И. Клинико-диагностическое значение енолазы и основного белка миелина у новорожденных с перинатальными гипоксическими поражениями ЦНС / М.И. Баканов, В.В. Алатырцев, О.В. Гончарова и др. // Российский педиатрический журнал. – 2003. – № 4. – С. 19-23.
9. Бардахчян Э.А. Структурно-функциональные изменения печени и мозга при эндотоксиновом шоке (ультраструктурное исследование) / Э.А.

- Бардахчян, Н.Г. Харланова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1997. – № 1. – С.17-21.
10. Болдырев А.А. Нейрональные рецепторы в клетках иммунной системы / А.А. Болдырев // Природа. – 2005. – № 7. – С. 22-27.
11. Бородкина Л.Е. Нейропротекторные свойства и механизм действия новых производных аналогов гамма-аминомасляной кислоты: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук: 14.00.25 / Бородкина Людмила Евгеньевна. – Волгоград, 2009. – 47 с.
12. Борщикова Т.И. Функциональный профиль цитокинов и иммунологическая дисфункция у нейрореанимационных больных / Т.И. Борщикова, Н.Н. Епифанцева, Ю.А. Чурляев и др. // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 42-49.
13. Бугаева Л.И. Острая токсичность субстанции гидрохлорида β -фенилглутаминовой кислоты при однократном внутрижелудочном введении мышам и крысам / Л.И. Бугаева, И.Н. Тюренков, В.В. Багметова и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – № 4. – С. 34-37.
14. Волотова Е.В. Нейропротективное действие гидрохлорида β -фенилглутаминовой кислоты (РГПУ-135) при недостаточности мозгового кровообращения у крыс / Е.В. Волотова, Н.В. Мазина, Д.В. Куркин, И.Н. Тюренков // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2013. – № 1. – С. 40-42.
15. Воробьев П.А. Инсульт. Нормативные документы. М.: Ньюдиамед, 2010. – 480 с.
16. Воронина Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – С. 153-161.
17. Воронина Т.А. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических

веществ / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – С. 126-130.

18. Воронина Т. А. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия / Т.А. Воронина, Р.У. Островская, Т.Л. Гарибова // В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

19. Воронков А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.06 / Воронков Андрей Владиславович. – Волгоград, 2011. – 237 с.

20. Гаврилов Ю.В. Взаимодействие нервной и иммунной систем при стрессе / Ю.В. Гаврилов, Е.А. Корнева // Медицинский академический журнал, Т. 9, № 1, – 2009, – С. 11-27.

21. Ганнушкина И.В. Иммунологические аспекты травмы и сосудистых поражений мозга. М.: Медицина, 1974. – 198 с.

22. Ганнушкина И.В. Патоморфологические механизмы нарушения мозгового кровообращения и новые направления в их профилактике и лечении / И.В. Ганнушкина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1996. – № 1. – С. 14-18.

23. Гланц С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

24. Голосная Г.С. Роль ингибиторов апоптоза в диагностике и прогнозировании исходов перинатальных гипоксических поражений головного мозга у новорожденных / Г.С. Голосная // Педиатрия. – 2005. – № 3. – С. 30-35.

25. Горбачева С.В. Фармакологическая коррекция повреждений нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения / С.В. Горбачева, И.Ф. Беленичев,

- В.В. Дунаев, Н.В. Бухтиярова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т.70, №6. – С.13-16.
26. Гриневич В.В. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в системе: гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников при воспалении / В.В. Гриневич, О.В. Волкова, И.Г. Акмаев // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 5 – С. 10-14.
27. Гришанова Т.Г. Повреждение головного мозга при тяжелой травме: значимость клинических шкал и нейрональных маркеров / Т.Г. Гришанова, А.В.Будаев, Е.В. Григорьев // Медицина неотложных состояний. – 2011. – № 1-2(32-33). – С. 86-90.
28. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В. Механизмы нейротрофического и нейропротекторного действия препарата церебролизин при ишемии головного мозга / О.А. Громова, И.Ю. Торшин, И.В. Гоголева // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – № 3. – С. 43-18.
29. Гусев Е.И. Церебральный инсульт / Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов, А.Н. Ясаманова, И.А. Щукин, Т.И. Колесникова // Consilium Medicum. – 2014. – Т. 16, № 12. – С. 13-17.
30. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. М.: Медицина, 2001. – 328 с.
31. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Киликовский В.В., Стаховская Л.В., Айриян Н.Ю. Проблема инсульта в Российской Федерации / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, В.В. Киликовский и др. // Качество жизни. – 2006. – №2(13). – С. 10-14.
32. Гусев Е.И. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной ишемии / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, А.В. Коваленко, М.А. Соколов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1999. – № 2. – С. 65-70.

33. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мартынов М.Ю. Церебральный инсульт: проблемы и решения / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, М.Ю. Мартынов // Вестн. РАМН. – 2003. – № 11. – С. 44-48.
34. Гусев Е.И. Нейропротективная терапия ишемического инсульта / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова // Нервные болезни. – 2002. – № 1. – С. 3-7.
35. Егоренкова Е.В. Индивидуальные психологические особенности больных цереброваскулярной болезнью на фоне цитокиновой терапии / Е.В. Егоренкова, А.Ш. Розентул, А.Б. Смолянинов // Нейроиммунопатология. – 2003. – № 1. – С. 49-50.
36. Епишина В.В., Сравнительное изучение психотропной активности гетероциклических производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / Епишина Виктория Владимировна. – Волгоград, 2006. – 25 с.
37. Ерофеева М. Структурно-функциональное состояние тимуса при адаптации крыс к условиям повышенной гравитации / М. Ерофеева, И.Б. Краснов, М.Р. Сапин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 35, № 2. С.219-222.
38. Жданов Г.Н. Изучение содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных в остром периоде ишемического инсульта / Г.Н. Жданов, М.М. Герасимова // Цитокины и воспаление. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 27-30.
39. Жданов Г.Н. Клинические и иммунологические аспекты в дифференциальной диагностике, лечении и прогнозировании ишемического инсульта: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2007. – 50 с.
40. Зими́на И.В. Взаимосвязь тимуса и тимических пептидов с нервной и эндокринной системами / И.В. Зими́на, О.В. Белова, Т.И. Торховская и др. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015, №1. – С. 18-29.
41. Калинина Н.М. Травма: воспаление и иммунитет / Н.М. Калинина, А.Е. Сосюкин, Д.А. Вологжанин и др. // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 28-35.

42. Кашаева Л.Н. Иммунологические нарушения и роль их коррекции в профилактике пневмонии при церебральных инсультах: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2005. – 21 с.
43. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб.: Фолиант, 2008. – 549 с.
44. Кладова Е.А. Клинико-конституциональные и иммунологические характеристики больных, перенесших ишемический инсульт с алкогольной энцефалопатией: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Иркутск, 2010. – 23 с.
45. Князева А.С. Частота полиморфизма генов провоспалительных цитокинов у больных хронической ишемией головного мозга в Забайкальском крае / А.С. Князева, Н.Н. Страмбовская // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, – 2014, – № 1(95). – С. 30-34.
46. Корнева Е.А. Введение в иммунофизиологию: учеб. пособие / Е.А. Корнева. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2003. – 48 с.
47. Костанян И.А. Рецепторы нервных клеток / И.А. Костанян, Е.В. Наволоцкая, Р.И. Нуриева и др. // Биоорганическая химия. – 1997, Т. 23, № 10. – С. 805-808.
48. Кривицкая А.Н. Сравнительная характеристика психотропных свойств солей и композиций фенибута с органическими кислотами: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Кривицкая Анастасия Николаевна. – Волгоград, 2012. – 24 с.
49. Крыжановский Г.Н. Нейроиммунология / Г.Н. Крыжановский, С.В. Магаева, С.Р.Макаров. – М.: Медицина, 1997. – 297 с.
50. Кудрявцева Н.Н. Нарушение клеточного цикла в тимусе и селезенке у самцов мышей под влиянием хронического социального стресса: эффекты диазепама / Н.Н. Кудрявцева, А.В. Шурлыгина, Е.В. Мельникова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – N 4. – С. 391-394.
51. Кульчиков А. Е., Моложавая О. С., Скачкова О. В. и др. Сравнительное изучение иммунокорригирующего действия нейропептидных препаратов при

острой экспериментальной цереброваскулярной патологии / А.Е. Кульчиков, О.С. Моложавая, О.В. Скачкова и др. // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 38-43.

52. Кульчиков А.Е. Нейроиммунные нарушения при геморрагическом инсульте и пути их коррекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.03 / Кульчиков Андрей Евгеньевич. – Москва, 2012. – 24 с.

53. Кульчиков А.Е. Нарушение фагоцитоза и его фармакокоррекция при геморрагическом инсульте / А.Е. Кульчиков, С.Г. Морозов, Е.А. Гриненко, А.Н. Макаренко // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 102-107.

54. Куркин Д.В. Церебропротекторные свойства композиций фенибута с некоторыми органическими кислотами при нарушениях мозгового кровообращения: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.03.06 / Куркин Денис Владимирович. – Волгоград, 2013. – 24 с.

55. Лисяный Н.И. Нервные клетки их иммунные функции / Н.И. Лисяный // Аллергология и иммунология. – 2004. – Т. 5, № 1. – С. 193-194.

56. Литвинов А.А. Церебропротекторные свойства солей гамма-оксимасляной кислоты и некоторые аспекты механизма их действия: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.03.06 / Литвинов Андрей Андреевич. – Волгоград, 2015. – 25 с.

57. Лупинская З.А. Эндотелий сосудов – основной регулятор местного кровотока // Вестник КРСУ. – 2003. – № 7. – С. 43-56.

58. Макарова Л.М. Экспериментальная оценка эффективности глицина и его фосфорилированного производного при ишемических повреждениях головного мозга / Л.М. Макарова, В.Е. Погорелый // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т.69, №6. – С.24-26.

59. Макарова, Л.М. Новые производные нейромедиаторных аминокислот как перспективные нейропротекторы / Л.М. Макарова, В.Е. Погорелый // Проблемы фармацевтической науки и практики: сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Владикавказ. – 2013. – С. 196-197.

60. Меркушенкова О.В. Спектр психотропного действия новых производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот, имеющих сходные ароматические и гетероциклические заместители: автореф. дис. ... канд.мед.наук: 14.00.25 / Меркушенкова Ольга Валерьевна. – Волгоград, 2009. – 26 с.
61. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: в 2 т. / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян. - М.: Гриф. и К, 2012. – 944 с.
62. Назаренко Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. М.: Медицина. – 2007. – 541 с.
63. Никифорова Т.А. Содержание цитокинов в сыворотке крови как предикторов геморрагической трансформации ишемического инсульта / Т.А. Никифорова, Б.М. Доронин, С.А. Песков // Журнал неврологии и психиатрии. 2014 – № 3(2). – С. 20-26.
64. Оганов Р.Г. Новый способ оценки индивидуального сердечно-сосудистого суммарного риска для населения России / Р.Г. Оганов // Кардиология. – 2008. – № 5. – С. 87 – 91.
65. Охтова Ф.Р. Ишемический инсульт и показатели клеточного и гуморального иммунитета (клинико-иммунологическое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2014. – 29 с.
66. Петров В.И. Средство, обладающее антидепрессантным, анксиолитическим, нейропротекторным и иммуностимулирующим действием / В.И. Петров, И.Н.Тюренков, В.В. Багметова и др. // патент на изобретение RUS 2429834, 23.07.2010.
67. Петров В.И. Современные направления исследований и клинического применения глутаматергических средств / В.И. Петров, Н.В. Онищенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т.65, № 4. – С. 66-70.

68. Раевский В.В. Онтогенез медиаторных систем мозга: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.13 / Раевский Владимир Вячеславович. – Москва, 1988. – 35 с.
69. Раевский К.С., Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты / К.С. Раевский, В.П. Георгиев. – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
70. Ребенко Н.М. Клинико-иммунологические особенности у больных в остром периоде инсульта: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 2004. – 23 с.
71. Ребенко Н.М. Состояние иммунной системы у больных с острым инсультом / Н.М. Ребенко, В.С. Кожевников, Т.Ф. Попова и др. // Инсульт. – 2005. – № 14. – С.46-49.
72. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
73. Робертус А.И. Эндотелиопротективные свойства производных ГАМК при недостаточности половых гормонов: дис. ...канд. биол. наук: 14.03.06 / Робертус Александра Игоревна. – Волгоград, 2010. – 155 с.
74. Рыбакина Е.Г. Клеточные и молекулярные механизмы взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при синдроме хронической усталости в эксперименте / Е.Г. Рыбакина, С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева, Е.А. Корнева // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, № 12. – С. 1324-1335.
75. Самотруева М.А. Изучение регуляторных механизмов действия аналогов ГАМК на нейроиммунную систему: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.06, 03.03.01 / Самотруева Марина Александровна. – Волгоград, 2012. – 373 с.
76. Сапин М.Р. Иммунная система, стресс и иммунодефицит / М.Р. Сапин, Д.Б. Никитюк. – М.: «Джангар», 2000. – 184 с.
77. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме: Пер. с англ / Г. Селье. – М., 1960. – 254 с.

78. Семченко В.В. Синаптическая пластичность головного мозга / В.В. Семченко, С.С. Степанов, Н.Н. Боголепов. – Омск: Омская областная типография, 2008. – 408 с.
79. Сепиашвили Р.И. Иммунная система мозга и спинномозговой жидкости / Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т. 14, № 4. – С. 241-253.
80. Сергеева С. П. Морфологические характеристики тимуса крыс Вистар в условиях экспериментального внутримозгового кровоизлияния / С.П. Сергеева, Л.М. Ерофеева, М.Р. Сапин, Е.В. Коплик // Морфология. – 2010. – Т. 137. № 2. – С. 35-38.
81. Сергеева С. П. Морфофункциональное состояние тимуса, цитокиновый профиль и клеточный иммунный статус при остром нарушении мозгового кровообращения.: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.25 / Сергеева Светлана Павловна. – Москва, 2009. – 24 с.
82. Скворцова В.И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и нейропротекция/ В.И. Скворцова // Вестник РАМН. – 2003. – № 11. – С.74-80.
83. Спасов А.А. Методологический подход для изучения нейропротекторной активности в эксперименте / А.А. Спасов, В.Ю. Федорчук, Н.А. Гурова и др. // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2014. – №4. – С. 39-45.
84. Справочник лекарств РЛС [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rlsnet.ru/> (март 2016).
85. Субботина Н.С., Олейник Е.К., Чуров А.В, Активация регуляторных т-клеток у больных сосудистыми заболеваниями головного мозга / Н.С. Субботина, Е.К. Олейник, А.В. Чуров и др. // Медицинский академический журнал. – 2012. – Т. 12, № 3. – С. 30-34.
86. Суслина З А. Сосудистые заболевания головного мозга. 2-е издание / З.А. Суслина, Ю.Я. Варакин, Н.В. Верещагин. – М.: МЕДпресс-информ. – 2009. – С. 352.

87. Тюренков И.Н. Депрессивное состояние у крыс при хроническом комбинированном стрессе, вызванном сочетанием разномодальных стрессоров / И.Н. Тюренков, В.В. Багметова, Ю.В. Чернышева, Д.Д. Бородин // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 9, – С. 1045-1056.
88. Тюренков И.Н. Экспериментальное обоснование применения фенибута как модулятора иммунного ответа / И.Н. Тюренков, М.А. Сомотруева, Н.Р. Кулешевская, Т.К. Сережникова // Фармация. – 2010. – № 4. – С. 42-44.
89. Тюренков И.Н. Влияния фенибута и его композиции с никотиновой кислотой на гемостаз крыс с ишемией головного мозга / И.Н. Тюренков, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75, № 4. – С.10-12.
90. Фатеев И.В. Модель нарушения мозгового кровообращения с поэтапной перевязкой общих сонных артерий / И.В. Фатеев, В.Н. Быков, С.В. Чепур и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 9. – С. 350-354.
91. Хайлов Н.А. Влияние докозагексаеноилдофамина и дофамина на кровоснабжение мозга / Н.А. Хайлов, Т.С. Ганышина, Р.С. Мирзоян // Методология флоуметрии. – 2002. – № 6. – С.151-155.
92. Харченко Е.П. Иммунная уязвимость мозга / Е.П. Харченко, М.Н. Клименко // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова. – 2007. – №1. – С. 68-77.
93. Харченко Е.П. Иммунная привилегия мозга: новые факты и проблемы / Е.П. Харченко // Иммунология. -2006. – № 1. – С. 51-56.
94. Черешнев В.А. Иммунофизиология: проблемы и перспективы развития / В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков, В.Г. Климин // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2003. – № 1. – С. 47-54.
95. Чехонин В.П. Основной белок миелина. Строение, свойства, функции, роль в диагностике демиелинизирующих заболеваний / В.П. Чехонин, О.И.

- Гурина, Т.Б. Дмитриева и др. // Вопросы медицинской химии. 2000. – Т. 46, № 6. – С. 549-563.
96. Чуканова Е.И. Отдельные механизмы патогенеза формирования недостаточности мозгового кровообращения / Е.И. Чуканова, А.С. Чуканова // Фарматека. – 2014. – № 13. – С. 14-19.
97. Чуралева О.В. Особенности нейрофункциональных и иммунологических нарушений в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта и их коррекция: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 2006. – 16 с.
98. Шерстнев В.В. Нейротрофические факторы и аутоантитела к ним как молекулярные префакторы нарушений функции мозга / В.В. Шерстнев, М.А. Грудень, В.И. Скворцова, В.А. Таболин // Акушерство и гинекология. – 2002. – № 2. – С. 48-51.
99. Шибилова М.У. Генетические аспекты ишемического инсульта. Иммуновоспалительные цитокины в патогенезе ишемического инсульта / М.У. Шибилова // Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2013. – №2. – С. 131-133.
100. Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury / K. Abe // J. Cerebr. Blood. F. Met. – 2000. – Vol. 20, № 10. – P. 1393-1408.
101. Adams H.P. Treatment of acute ischemic stroke: selecting the right treatment for the right patient / H.P. Adams // Eur. Neurol. – 2001. Vol. 45, № 2. – P. 61-66.
102. Allan S.M. Interleukin-1 and neuronal injury / S.M. Allan, P.J. Tyrrell, N.J. Rothwell // Nat. Rev. Immunol. – 2005. – Vol. 5, № 8. – P. 629-640.
103. Amantea D. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators / D. Amantea, G. Nappi, G. Bernardi et al. // FEBS J. – 2009. – Vol. 276, №1. – P. 13-26.

104. Ceulemans A.G. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia / A.G. Ceulemans, T. Zgavc, R. Kooijman et al. // *J. Neuroinflammation*. – 2010. – № 7. – P. 74.
105. Armstrong M.D. Immune-endocrine interactions of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis: integration, communication and homeostasis. / M.D. Armstrong, J.R. Klein // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2001. – Vol. 49, № 3. – P. 231-237.
106. Arumugam T.V. Stroke and T-cells / T.V. Arumugam, D.N. Granger, M. Mattson // *Neuromolecular Med.* – 2005. – Vol. 7, № 3. – P. 229-242.
107. Baker W.E. Thrombolytic therapy: current clinical practice / W.E. Baker // *Hematol. Oncol. Clin.* – 2005. – Vol. 19. – P. 147-181.
108. Baroja-Mazo A. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response / A. Baroja-Mazo, F. Martín-Sánchez, A. Gomez et al. // *Nat. Immunol.* – 2014. – Vol. 15, № 8. – P. 738- 748.
109. Basta G. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes / G. Basta, A.M. Schmidt, R. DeCaterina // *Cardiovasc. Res.* 2004. – Vol. 63, №4. – P. 582-592.
110. Ben-Ari Y. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations / Y. Ben-Ari, J.L. Gaiarsa, R. Tyzio, R. Khazipov // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 4. – P. 1215-1284.
111. Ben-Horin, S. Neuroimmunology of the gut: physiology, pathology, and pharmacology / S. Ben-Horin, Y. Chowers // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 8, № 4. – P. 490-495.
112. Bertrand G. Evidence for a glutamate receptor of the AMPA subtype which mediates insulin release from rat perfused pancreas / G. Bertrand, R.Gross, R.Puech // *Br. J. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 106, № 2. – P. 354-359.
113. Blennow K. Neuron specific enolase in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for neuronal degeneration in dementia disorders? / K. Blennow, A. Wallin,

- R. Ekman // J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect. – 1994. Vol. 8, № 3. – P. 183-191.
114. Bohlen M. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination / M. Bohlen, A. Cameron, P. Metten et al. // J. Neurosci. Methods. – 2009. – Vol. 178, № 1. – P. 10-14.
115. Boldyrev A.A. Synaptic activation of glutamate transporters / A.A. Boldyrev, V.I. Kazey, T.A. Leinsoo // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – Vol. 324. – P. 133-139.
116. Brea D. Toll-like receptors 7 and 8 expression is associated with poor outcome and greater inflammatory response in acute ischemic stroke / D. Brea, T. Sobrino, M. Rodríguez-Yáñez // Clin. Immunol. – 2011 Vol. 139, № 2. – P. 193-198.
117. Buckley C.D. The resolution of inflammation / C.D. Buckley, D.W. Gilroy, C.N. Serhan et al. // Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 13, № 1. – P. 59-66.
118. Bustamante A. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: a systematic review and meta-analysis / A. Bustamante, T. Sobrino, D. Giralt et al. // J. Neuroimmunol. 2014. – Vol. 274, № 1-2. – P. 215-24.
119. Cai W. Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans / W. Cai, J. Uribarri, L. Zhu et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – Vol. 111, № 13. – P. 4940-4945.
120. Cekanaviciute E. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice / E. Cekanaviciute, N. Fathali, K.P. Doyle et al. // Glia. – 2014. – Vol. 62, № 8. – P. 1227-1240.
121. Ceruti S. The P2Y-like receptor GPR17 as a sensor of damage and a new potential target in spinal cord injury / S. Ceruti, G. Villa, T. Genovese et al. // Brain. – 2009. – Vol. 132-8. – P. 2206-2218.
122. Chamorro A. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease / A. Chamorro, J. Hallenbeck // Stroke. – 2006. – Vol. 37, № 32. – P. 291-293.

123. Chamorro Á. The immunology of acute stroke / Á. Chamorro, A. Meisel, A.M. Planas // *Nat. Rev. Neurol.* – 2012. – Vol. 8, № 7. – P. 401-410.
124. Chen B. Neuroprotective effect of grafting GDNF gene-modified neural stem cells on cerebral ischemia in rats / B. Chen, X.Q. Gao, C.X. Yang et al. // *Brain Res.* – 2009. – Vol. 1284. – P. 1-11.
125. Chen C.J. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells / C.J. Chen, H. Kono, D. Golenbock et al. // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13, № 7. – P. 851-856.
126. Chen Y.E. Neuroimmune Pharmacology as a Component of Pharmacology in Medical School Curriculum / Y.E. Chen // *J. Neuroimmune Pharmacol.* – 2011. – № 11. – P. 13-15.
127. Chu S.Y. Readmission for infective endocarditis after ischemic stroke or transient ischemic attack / S.Y. Chu, A.E. Merkler, N.T. Cheng, H. Kamel // *Neurohospitalist.* – 2015. – Vol. 5, №2. – P. 55-8.
128. Crutcher K.A., Debate: “is increasing neuroinflammation beneficial for neural repair?” / K.A. Crutcher, H.E. Gendelman, J. Kipnis // *J. Neuroimmune Pharmacol.* – 2006. – Vol. 1, № 3. – P. 195-211.
129. Cuartero M.I. N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ on istrosiglita zone / M.I. Cuartero, I. Ballesteros, A. Moraga et al. // *Stroke.* – 2013. – Vol. 44, № 12. – P. 3498-3508.
130. De Miguel Z. Behavioral coping strategies in response to social stress are associated with distinct neuroendocrine, monoaminergic and immune response profiles in mice / Miguel Z. De, O. Vegas, L. Garmendia et al. // *Behav. Brain Res.* – 2011. – Vol. 225, № 2. – P. 12.
131. De Raedt S. High natural killer cell number might identify stroke patients at risk of developing infections / S. De Raedt, A. De Vos, A.M. Van Binst et al. // *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* – 2015. – Vol. 2, № 2. – e71.
132. Denes A. Central and haematopoietic interleukin-1 both contribute to ischaemic brain injury / A. Denes, F. Wilkinson, B. Bigger et al. // *Dis. Model. Mech.* – 2013. – Vol. 6, № 4. – P. 1043-1048.

133. Desestret V. In vitro and in vivo models of cerebral ischemia show discrepancy in therapeutics effects of M2 macrophages / V. Desestret, A. Riou, F. Chauveau // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 6. – e67063.
134. Devuyst G. Recent progress in drug treatment for acute ischemic stroke / G. Devuyst, J. Bogousslavsky // Cerebrovasc. Dis. – 2001. – Vol. 11(1 suppl). – P. 71-79.
135. Dirnagl U. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view / U. Dirnagl, C. Iadecola, M.A. Moskowitz // Trends Neurosci. 1999. – Vol. 22, № 9. – P. 391-397.
136. Dirnagl U. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance / U. Dirnagl, J. Klehmet, J.S. Braun et al. // Stroke. – 2007. – Vol. 38(2 suppl). – P. 770-773.
137. Droge W. Plasma glutamate concentration and lymphocyte activity / W. Droge, H.P. Eck, M. Betzler et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 1998. – Vol. 114, № 2. – P. 124-128.
138. Estévez A.G. Arginase 1 regulation of nitricoxide production is key to survival of trophic factor-deprived motor neurons / A.G. Estévez, M.A. Sahawneh, P.S. Lange et al. // J. Neurosci. – 2006. – 26. – P. 8512-8516.
139. Fann D.Y. Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke / D.Y. Fann, S.Y. Lee, S. Manzanero // Cell Death Dis. – 2013. – Vol. 4. – e790.
140. Ferrer I. BDNF up-regulates TrkB protein and prevents the death of CA1 neurons following transient forebrain ischemia / I. Ferrer, J. Ballabriga, E. Marti // Brain Pathol. – 1998. – Vol. 8, № 2. – P. 253-261.
141. Ferrer L. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat / L. Ferrer, J. Krupinski, E. Goutan et al. // Acta. Neuropathol. – 2001. – Vol. 101. № 3. – P. 229-238.
142. Fisher M. Evolving stroke and the ischemic penumbra / M. Fisher, J.H. Garcia // Neurology. – 1996. – Vol. 47, № 4. – P. 884-888.

143. Galea J. The role of inflammation and interleu-kin-1 in acute cerebrovascular disease / J. Galea, D. Brough // *J. Inflamm. Res.* – 2013. Vol. 6. – P. 121-128.
144. Geenen V. The appearance of the thymus and the integrated evolution of adaptive immune and neuroendocrine systems / V. Geenen // *Acta. Clin. Belg.* – 2012. – Vol. 67, №3. – P. 209-213.
145. Gorina R. β 2 integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier / R. Gorina, R. Lyck, D. Vestweber, B. Engelhardt // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192, №1. – P. 324-337.
146. Gudi V. Spatial and temporal profiles of growth factor expression during CNS demyelination reveal the dynamics of repair priming / V. Gudi, J. Škuljec, Ö. Yildiz et al. // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, № 7. – e22623.
147. Guo Z. In Vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model / Z. Guo, L. Zhang, Z. Wu et al. // *Cell Stem Cell.* – 2014. – Vol. 14, № 2. – P. 188-202.
148. Haider L. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions / L. Haider, M.T. Fischer, J.M. Frisner et al. // *Brain.* – 2011. – Vol. 134(Pt 7). – P. 1914-1924.
149. Hallenbeck J. Immunomodulation Strategies for Preventing Vascular Disease of the Brain and Heart / J. Hallenbeck, G. Zoppo, T. Jacobs et al. // *Stroke.* – 2006. – Vol. 37, №12. – P. 3035-3042.
150. Hill J.J. Intracerebral chondroitinase ABC and heparansulfate proteoglycanglycan improve outcome from chronic stroke in rats / J.J. Hill, K. Jin, X.O. Mao et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, №23. – P. 9155-9160.
151. Ho P.P. Identification of naturally occurring fatty acids of the myelins sheath that resolve neuroinflammation / P.P. Ho, J.L. Kanter, A.M. Johnson et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 4, №137. – P. 137ra73.

152. Homan W.P. Studies on the immunosuppressive properties of cyclosporin a in rats receiving renal allografts / W.P. Homan, J.W. Fabre, K.A. Williams et al. // *Transplantation*. – 1980. – Vol. 29, №5. – P. 361-366.
153. Huang J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia / J. Huang, U.M. Upadhyay, R.J. Tamargo // *Surg. Neurol.* – 2006. – Vol. 66, № 3. – P. 232-245.
154. Hyakkoku K. Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia / K. Hyakkoku, J. Hamanaka, K. Tsuruma et al. // *Neuroscience*. – 2010. – Vol. 171, №1. – P. 258-267.
155. Iadecola C. The immunology of stroke: from mechanisms to translation / C. Iadecola, J. Anrather // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17, № 7. – P. 796-808.
156. Irwin, M.R. Human psychoneuroimmunology: 20 years of discovery / M.R. Irwin // *Brain Behav. Immun.* – 2008. – Vol. 22, № 2. – P. 129-139.
157. Iyer S.S. Mitochondrial cardiolipins required for Nlrp3 inflammasome activation / S.S. Iyer, Q. He, J.R. Janczy et al. // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 2. – P. 311-323.
158. Jin K.L. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia / K.L. Jin, X.O. Mao, D.A. Greenberg // *PNAS*. – 2002. – Vol. 97, № 18. – P. 10242-10247.
159. Kawai T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nat Immunol.* – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 373-384.
160. Kemeny M.E. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: a stepwise progression / M.E. Kemeny, M. Schedlowski // *Brain Behav. Immun.* – 2007. – Vol.21, № 8. – P.1009-1018.
161. Klehmet J. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial / J. Klehmet, H. Harms, M. Richter et al. // *Neuroscience*. – 2009. – Vol. 158, №3. – P. 1184-1193.

162. Konoeda F. Therapeutic effect of IL-12/23 and their signaling pathway blockade on brain ischemia model / F. Konoeda, T. Shichita, H. Yoshida et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – Vol. 402, №3. – P. 500-506.
163. Kooijman R. Insulin-like growth factorI: a potential neuroprotective compound for the treatment of acute ischemic stroke? / R. Kooijman, S. Sarre, Y. Michotte, J. DeKeyser // *Stroke.* – 2009. – Vol. 40. – P. 83-88.
164. Lafon M. The innate immune facet of brain / M. Lafon, F. Megret, M. Lafage // *Journal of Molecular Neuroscience.* – 2006. – Vol. 29, № 3. – P. 185-194.
165. Lalancette-Hébert M. Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury / M. Lalancette-Hébert, V. Swarup, J.M. Beaulieu et al. // *J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 32, № 30. – P. 10383-10395.
166. Leposavić G. Age-associated remodeling of thymopoiesis: role for gonadal hormones and catecholamines / G. Leposavić, M. Perisić // *Neuroimmunomodulation.* – 2008. – Vol. 15, № 4-6. – P. 290-22.
167. Leung P.Y. Toll-like receptor 7 preconditioning induces robust neuroprotection against stroke by a novel type I interferon-mediated mechanism / P.Y. Leung, S.L. Stevens, A.E. Packard et al. // *Stroke.* – 2012. – Vol. 43, № 5. – P. 1383-1389.
168. Liang X. Signaling via the prostaglandin E2 receptor EP4 exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia / X. Liang, L. Lin, N.S. Woodling et al // *J. Clin. Invest.* 2011. – Vol. 121, № 11. – P. 4362-4371.
169. Liesz A. The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: immunodepression versus immunomodulation / A. Liesz, S. Hagmann, C. Zschoche et al. // *Stroke.* – 2009. – Vol. 40, №8. – P. 2849-2858.
170. Liesz A. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke / A. Liesz, E. Suri-Payer, C. Veltkamp et al. // *Nature Med.* – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 192-199.
171. Lo E.H. Degeneration and repair in central nervous system disease / E.H. Lo // *Nat. Med.* – 2010. – Vol. 16, № 11. – P. 1205-1209.

172. Loser K. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8⁺ T cells / K. Loser, T. Vogl, M. Voskort // *Nat Med*. 2010. – Vol. 16, № 6. – P. 713-717.
173. Mabuchi T. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats / T. Mabuchi, K. Kitagawa, T. Ohtsuki et al. // *Stroke*. – 2000. – Vol. 31, № 7. – P. 1735-1743.
174. Maeda A. Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals / A. Maeda, B. Fadeel // *Cell Death Dis*. – 2014. – Vol. 5. – e1312.
175. Martinon F. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β / F. Martinon, K. Burns, J. Tschopp // *Mol. Cell*. – 2002. – Vol. 10, № 2. – P. 417-426.
176. Matt U. WAVE1 mediates suppression of phagocytosis by phospholipid-derived DAMPs / U. Matt, O. Sharif, R et al. // *J. Clin. Invest*. – 2013. – Vol. 123, № 7. – P. 3014-3024.
177. McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q et al.(). Neuroprotective function of the PGE₂ EP2 receptor in cerebral ischemia / L. McCullough, L. Wu, N. Haughey et al. // *J Neurosci*. – 2004. – Vol. 24, № 1. – P. 257-268.
178. Meisel C. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome / C. Meisel, J.M. Schwab, K. Prass // *Nat. Rev. Neurosci*. – 2005. – Vol. 6, № 10. – P. 775-786.
179. Meldrum B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology / B.S. Meldrum // *The Journal of nutrition*. – 2000. – Vol. 130. – P. 1007-1015.
180. Miller Y.I. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity / Y.I. Miller, S.H. Choi, P. Wiesner et al. // *Circ Res*. – 2011. – Vol. 108, № 2. – P. 235-248.

181. Miyata T. Beta 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis / T. Miyata, O. Oda, R. Inagi et al. // J. Clin. Invest. – 1993. – Vol. 92, №3. – P. 1243-1252.
182. Molniar E. Identification of functional ionotropic glutamate receptor proteins in pancreatic beta-cells and in islets of Langerhans / E. Molniar, A. Váradi, R.A. McIlhinney, S.J. Ashcroft // FEBS Lett. – 1995. – Vol. 371, № 3. – P. 253-267
183. Moloney M.G. Excitatory amino acids / M.G. Moloney // Natural Product Reports. – 2002. – Vol. 19, №5. – P. 597-616.
184. Moskowitz M.A. The science of stroke: mechanisms in search of treatments / M.A. Moskowitz, E.H. Lo, C. Iadecola // Neuron. – 2010. – Vol. 67, № 2. – P. 181-198.
185. Müller H.D. Brain-derived neurotrophic factor but not forced arm use improves long-term outcome after photothrombotic stroke and transiently upregulates binding densities of excitatory glutamate receptors in the rat brain / H.D. Müller, K.M. Hanumanthiah, K. Diederich // Stroke. – 2008. – Vol. 39, № 3. – P. 1012-21.
186. Muralikrishna Adibhatla R. Phospholipase A2, reactive oxygenspecies, and lipid peroxidation in cerebral ischemia / R. Muralikrishna Adibhatla, J.F. Hatcher // Free Radic. Biol. Med. – 2006. – Vol. 40, № 3. – P. 376-387.
187. Offner H., Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression / H. Offner, A. A. Vandenbark, P. D. Hurn // Neuroscience. – 2009. – Vol. Vol. 158, № 3. – P. 1098-1111.
188. Ooboshi H. Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia / H Ooboshi, S Ibayashi, T Shichita et al. // Circulation. – 2006. – Vol. 111, № 7. – P. 913-919.
189. Oto J. Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke

- patients / J. Oto, A. Suzue, D. Inui et al. // J. Anesth. – 2008. – Vol. 22, №3. – P. 207-212.
190. Podratz J.L. NGF rescues DRG neurons in vitro from oxidative damage produced by hemodialyzers / J.L. Podratz, A.J. Windebank // Neurotoxicology. – 2005. – Vol. 26, № 3. – P. 343-350.
191. Prass K. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation / K. Prass, C. Meisel, C. Höflich et al. // J. Exp. Med. – 2003. – V. 198, № 5. – P. 725-736.
192. Qiu J. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia / J. Qiu, M. Nishimura, Y. Wang et al. // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2008. – Vol. 28, № 5. – P. 927-938.
193. Qu W.S. Galectin-1 attenuates astrogliosis-associated injuries and improves recovery of rats following focal cerebral ischemia / W.S. Qu, Y.H. Wang, J.F. Ma et al. // J. Neurochem. – 2011. – Vol. 116, №2. – P. 217-226.
194. Quintá H.R. Glycan- dependent binding of galectin-1 to neuropilin-1 promotes axonal regeneration after spinal cord injury / H.R. Quintá, J.M. Pasquini, G.A. Rabinovich, L.A. Pasquini // Cell Death Differ. – 2014. – Vol. 21, № 6. – P. 941-955.
195. Reed-Geaghan E.G. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation / E.G. Reed-Geaghan, J.C. Savage, A.G. Hise, G.E. Landreth // J. Neurosci. – 2009. – Vol. 29, № 38. – P. 11982-11992.
196. Romer C. Blocking Stroke-Induced Immunodeficiency Increases CNS Antigen-Specific Autoreactivity But Does Not Worsen Functional Outcome after Experimental Stroke / C. Romer, O. Engel, K. Winek et al. // The Journal of Neuroscience. – 2015. – Vol. 35, № 20. – P. 7777-7794.
197. Sacco R. L. Experimental treatments for acute ischaemic stroke / R.L. Sacco, J.I. Chong, S. Prabhakaran, M.S. Elkind // Lancet. – 2007. – Vol. 369, № 9558. – P. 331-341.

198. Sali A. Psychoneuroimmunology. Fact or fiction? / A. Sali // Aust. Fam. Physician. – 1997. – Vol. 26, № 11. – P. 1291-1294.
199. Sarrafzadeh A. Immunodepression After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage / A. Sarrafzadeh, F. Schlenk, A. Meisel et al. // Stroke. – 2011. – Vol. 42, № 1. – P. 53-58.
200. Satou T. Neurotrophic effects of FPF-1070 (Cerebrolysin) on cultured neurons from chicken embryo dorsal root ganglia, ciliary ganglia, and sympathetic trunks / T Satou, T Itoh, Y Tamai et al. // J. Neural Transm. – 2000. – Vol. 107, № 11. – P. 1253-1262.
201. Schellinger P.D. An update on trombolytic therapy for acute stroke / P.D. Schellinger, M. Kaste, W. Hacke // Curr. Opin. Neurol. – 2004. – Vol. 17, № 1. – P. 69-77.
202. Schubert C. Psychoneuroimmunology: an update / C. Schubert, G. Schüssler // Z. Psychosom. Med. Psychother. – 2009. – Vol. 55, № 1. – P. 3-26.
203. Serena J. The Prediction of Malignant Cerebral Infarction by Molecular Brain Barrier Disruption Markers / J. Serena, M. Blanco, M. Castellanos et al. // Stroke. – 2005. – Vol. 36, № 9. – P. 1921-1926.
204. Serhan C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology / C.N. Serhan // Nature. – 2014. – Vol. 510, № 7503. – P. 92-101.
205. Shanta S.R. Global changes in phospholipids identified by MALDIMS in rats with focal cerebral ischemia / S.R. Shanta, C.S. Choi, J.H. Lee et al. // J. Lipid Res. – 2012. – Vol. 53, № 9. – P. 1823-1831.
206. Shichita T. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain / T. Shichita, E. Hasegawa, A. Kimura et al. // Nat. Med. 2012. – Vol. 18, № 6. – P. 911-917.
207. Shichita T. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury / T. Shichita, Y. Sugiyama, H. Ooboshi et al. // Nat. Med. – 2009. – Vol. 15, № 8. – P. 946-950.
208. Skinner R. Psychoneuroimmunology of stroke / R. Skinner, R. Georgiou, P. Thornton, N. Rothwell // Neurol. Clin. – 2006. – Vol. 24, № 3. – P. 561-583.

209. Smirkin A. Iba1+/NG2+ macrophage-like cells expressing a variety of neuroprotective factors ameliorate ischemic damage of the brain / A. Smirkin, H. Matsumoto, H. Takahashi et al. // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2010. – Vol. 30, № 3. – P. 603-615.
210. Solaroglu I. New Missions for an Old Agent: Granulocyte-Colony Stimulating Factor in the Treatment of Stroke Patients / I. Solaroglu, M. Digicaylioglu, K.G. Evren, H. Zhang John // Curr. Med. Chem, – 2015. – Vol. 22, № 10. – P. 1302-1309(8)
211. Sondag C.M. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia / C.M. Sondag, G. Dhawan, C.K. Combs // J Neuroinflammation. – 2009. – Vol. 6. – P. 1.
212. Spohr T.C. Astrocytes treated by lysophosphatidic acid induce axonal outgrowth of cortical progenitors through extracellular matrix protein and epidermal growth factor signaling pathway / T.C. Spohr, R.S. Dezone, S.K. Rehen, F.C. Gomes // J, Neurochem. – 2011. – Vol. 119, № 1. – P. 113-123.
213. Starossom S.C. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration / S.C. Starossom, I.D. Maccanfroni, Imitola J et al. // Immunity. – 2012. – Vol. 37, № 2. – P. 249-263.
214. Stevens S.L. Multiple preconditioning paradigms converge on interferon regulatory factor-dependent signaling to promote tolerance to ischemic brain injury / S.L. Stevens, P.Y. Leung, K.B. Vartanian et al. // J Neurosci. – 2011. – Vol. 31, № 23. – P. 8456-8463.
215. Stockhorst, U. Conditioning mechanisms and psychoneuroimmunology / U. Stockhorst, S. Klosterhalfen // Psychother. Psychosom. Med. Psychol. – 2005. – Vol. 55, № 1. – P. 5-19.
216. Sun S. Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways / S. Sun, T. Sursal, Y. Adibnia et al. // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 3. – e59989.

217. Suzuki Y. Involvement of Mincle and Syk in the changes to innate immunity after ischemic stroke / Y. Suzuki, Y. Nakano, K. Mishihiro et al. // *Sci. Rep.* – 2013. – Vol. 3. – P. 3177.
218. Suzuki Y. Pharmacological inhibition of TLR4-NOX4 signal protects against neuronal death in transient focal ischemia / Y. Suzuki, K. Hattori, J. Hamanaka et al. // *Sci.Rep.* – 2012. – Vol. 2. – P. 896.
219. Tang S.C. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits / S.C. Tang, T.V. Arumugam, X. Xu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, № 34. – P. 13798-13803.
220. Taniguchi H. Function of prostaglandin E2 EP receptors in the acute outcome of rodent hypoxic ischemic encephalopathy / H. Taniguchi, C. Anacker, G.B. Suarez-Mier et al. // *Neurosci. Lett.* – 2011. – Vol. 504, № 3. – P. 185-190.
221. Tsai S.Y. DAMP molecule S100A9 acts as a molecular pattern to enhance inflammation during influenza A virus infection: role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 pathway / S.Y. Tsai, J.A. Segovia, T.H. Chang et al. // *PLoS Pathog.* – 2014. – Vol. 10, № 1. – e1003848.
222. Tuttolomondo A. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke / A. Tuttolomondo, D. di Raimondo, R. di Sciacca et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2008. – Vol. 14, № 33. – P. 3574-3589.
223. Uchida K. Redox-derived damage-associated molecular patterns: function of lipid peroxidation adducts / K. Uchida // *Redox. Biol.* – 2013. – Vol. 1. – P. 94-96.
224. Vakili A. Pentoxifylline attenuates TNF- α protein levels and brain edema following temporary focal cerebral ischemia in rats / A Vakili, S. Mojarrad, M.M. Akhavan, A. Rashidy-Pour // *Brain Res.* – 2011. – Vol. 1377. – P. 119-25.
225. Vila N. Levels of Anti-Inflammatory Cytokines and Neurological Worsening in Acute Ischemic Stroke / N. Vila, J. Castillo, A. Davalos et al. // *Stroke.* – 2003. – Vol. 34, № 3. – P. 671-675.
226. Vila N. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. / N. Vila, J. Castillo, A. Davalos, A. Ghamorro // *Stroke.* – 2001. – Vol. 31, № 10. – P. 2325-2329.

227. Vogelgesang A. Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infection after stroke / A. Vogelgesang, U. Grunwald, S. Langner et al. // *Stroke*. – 2008. – Vol. 39, № 1. – P. 237-241.
228. Walko T.D. Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA: a novel DAMP in pediatric traumatic brain injury / T.D. Walko, R.A. Bola, J.D. Hong et al. // *Shock*. – 2014. – Vol. 41, № 6. – P. 499-503.
229. Wang C. Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury / C. Wang, A. Shuaib // *Prog. Neurobiol.* – 2007. – Vol. 83, № 3. – P. 140-148.
230. Wang Q. The inflammatory response in stroke / Q. Wang, X. Tang, M. Yenari // *J. Neuroimmunol.* – 2007. – Vol. 184, № 1-2. – P. 53-68.
231. Wardlaw J.M. Thrombolytic therapy with recombinant tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke – where do we go from here? A cumulative meta-analysis / J.M. Wardlaw, P.A.G. Sandercock, E. Berge // *Stroke*. – 2003. – Vol. 34, № 6. – P. 1437-1442.
232. Weil Z.M. Ischemia-induced hyperglycemia: consequences, neuroendocrine regulation, and a role for RAGE / Z.M. Weil // *Horm Behav.* – 2012. – Vol. 62, № 3. – P. 280-285.
233. Wenceslau C.F. Mitochondrial damage-associated molecular patterns and vascular function / C.F. Wenceslau, C.G. McCarthy, T. Szasz et al. // *Eur. Heart J.* – 2014. – Vol. 35, № 18. – P. 1172-1177.
234. West X.Z. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands / X.Z. West, N.L. Malinin, A.A. Merkulova et al. // *Nature*. – 2010. – Vol. 467, №7318. – P. 972-976.
235. Xiong X. Increased Brain Injury and Worsened Neurological Outcome in Interleukin-4 Knockout Mice After Transient Focal Cerebral Ischemia / X. Xiong, G. Barreto, L. Xu et al. // *Stroke*. – 2011. – Vol. 42, № 7. – P. 2026-2032.
236. Yang Y. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for Toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages / Y. Yang, B. Liu, J. Dai et al. // *Immunity*. – 2007. – Vol. 26, № 2. – P. 215-226.

237. Zhang J. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats / J. Zhang, H.K. Takahashi, K. Liu et al. // *Stroke*. – 2011. – Vol. 42, № 5. – P. 1420-1428.
238. Zhang Q. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang, M. Raoof, Y. Chen et al. // *Nature*. – 2010. – Vol. 464, № 7285. – P. 104-107.
239. Ziegler G. Blocking TLR2 in vivo protects against accumulation of inflammatory cells and neuronal injury in experimental stroke / G. Ziegler, D. Freyer, D. Harhausen et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2011. – Vol. 31, № 2. – P. 757-766.
240. Zijlstra G.S. Efficacy of a new pulmonary cyclosporine a powder formulation for prevention of transplant rejection in rats / G.S. Zijlstra, J. Wolting, J. Prop et al. // *J. Heart Lung Transplant.* – 2009. – Vol. 28, № 5. – P. 486-492.
241. Ziv Y. A Novel Immune-Based Therapy for Stroke Induces Neuroprotection and Supports Neurogenesis. / Y. Ziv, A. Finkelstein, Y. Geffen et al. // *Stroke*. 2007. – Vol. 38(part 2). – P. 774-782.