

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНИБУТА И НЕЙРОГЛУТАМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ФОНЕ ИЗМЕНЕННОЙ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ

Е. В. Волотова, И. С. Филина, Д. А. Бакулин, Д. В. Куркин, И. Н. Тюренков<sup>1</sup>

Изучена церебропротекторная активность фенильных производных гамма-аминомасляной (фенибута) и *L*-глутаминовой кислоты (нейроглутама) при моделировании ишемии головного мозга (ИГМ) на фоне интактного и измененного иммунитета животных. Исследуемые вещества вводились внутривентриально соответственно в дозах 25 и 26 мг/кг в течение 7 дней после завершения моделирования ИГМ методом поэтапной перевязки общих сонных артерий. Установлено, что супрессия иммунной системы (ИС), вызванная 13-дневным пероральным введением циклоспорина ежедневно в дозе 5 мг/кг, ухудшает течение ИГМ, что проявляется увеличением летальности, более выраженным неврологическим дефицитом, более высоким содержанием в сыворотке крови маркеров повреждения нервной ткани нейронспецифической енолазы (NSE) и основного белка миелина (MBP), снижением мышечной силы, нарушением координации движений, угнетением двигательной и ориентировочно-исследовательской активности по сравнению с животными с ишемией мозга и интактным иммунитетом. ИГМ в условиях стимуляции ИС, вызванной 7-кратным внутривентриальным введением липополисахарида (пирогенал, Россия) через день в дозе 10 мкг/кг, вызывала меньшую летальность крыс, а у выживших животных наблюдался меньший неврологический дефицит и более низкие уровни NSE и MBP в сыворотке крови в среднем на 35 % ( $p \leq 0,05$ ), более высокие показатели координации движений, мышечной силы и локомоторной активности в среднем на 90 % ( $p \leq 0,05$ ). Состояние иммунной системы оказывало значительное влияние на нейропротекторное действие исследуемых веществ при ИГМ. Нейроглутам был эффективен как при интактном иммунитете животных, так и на фоне измененной иммунореактивности. 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 в большей степени был выражен на фоне активированного иммунитета животных, а при иммуносупрессии его эффективность была низкой.

**Ключевые слова:** нарушение мозгового кровообращения; ишемия головного мозга; иммунная система; иммуносупрессия; иммуностимуляция; мозговой кровоток; неврологический дефицит; поведенческий дефицит; NSE; MBP; фенибут; нейроглутам; крысы.

### ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания являются одной из основных проблем современной медицины [5]. Ишемические поражения головного мозга превалируют над геморрагическими и приводят к нарушению гомеостаза и дисбалансу взаимодействия нервной и иммунной систем (ИС) [13]. 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.

С одной стороны, имеется большое количество данных, показывающих, что в результате инсульта происходит супрессия ИС и возрастает риск развития инфекционных заболеваний, что негативно сказывается на состоянии пациентов [15]. Если депрессия ИС длительная, стадия разрешения воспаления с освобождением от продуктов некроза и последующая регенерация не наступают [14], что существенно ослабляет эффективность церебропротекторной терапии. 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 [13].

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет, Россия, 400131, Волгоград, пл. Павших борцов.

Представленные данные подчеркивают необходимость учета при выборе противоинсультных препаратов возможных механизмов взаимодействия нервной и иммунной систем и особенностей действия нейропротекторных средств в условиях различного состояния иммунитета.

В связи с вышеизложенными фактами при экспериментальном нарушении мозгового кровообращения (НМК) представляется важным оценить терапевтический эффект веществ, имеющих влияние не только на нервную, но и на иммунную систему. В настоящей работе были исследованы вещества, сходные по структуре: фенибут и нейроглутам, которые являются  $\beta$ -фенильными производными ГАМК и глутаминовой кислоты, соответственно. Следует отметить, что в ранее проведенных исследованиях установлены иммунокорригирующие свойства фенибута [9] и иммуностимулирующее действие нейроглутама [6, 8]. Поэтому целью данного исследования явилось изучение нейропротекторного действия этих веществ при ишемическом поражении головного мозга (ГМ) в условиях интактного и измененного состояния ИС животных.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 195 аутобредных белых крысах-самцах в возрасте 6 мес массой 250–300 г. Все животные были доставлены из питомника ФГУП ПЛЖ “Рапполово” РАН и содержались в стандартных условиях вивария с естественным 12-часовым свето-темновым режимом при температуре воздуха ( $20 \pm 2$ ) °С, влажности 50–65 % и свободном доступе к воде и полнорационному гранулированному корму (ГОСТ Р 50258–92). При работе соблюдались правила лабораторной практики (Приказ МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н) и ГОСТ Р 53434–2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”. Исследование одобрено региональным независимым этическим комитетом ГУ Волгоградский медицинский научный центр (протокол № 132–2012).

Выполнено 3 серии экспериментов на животных с различным состоянием ИС: интактной, подавленной и активированной. Каждая серия включала по 4 группы животных. Первая группа — ложнооперированные (ЛО) животные (количество в группе 15 особей,  $n = 15$ ), которым проводили оперативные вмешательства, аналогичные группе с ишемией головного мозга (ИГМ) только без непосредственной перевязки общих сонных артерий (ОСА). Вторая группа — животные контрольной группы ( $n = 20$ ) с ИГМ (контроль — ишемия), вызванной поэтапной необратимой окклюзией ОСА с интервалом в 3 сут [10], и получавших в качестве терапии физиологический раствор внутривенно в объеме 0,1 мл на 100 г массы тела. Третья и четвертая группы животных ( $n = 15$ ) получали нейроглутам в дозе 26 мг/кг и фенибут в дозе 25 мг/кг (субстанции веществ синтезированы на кафедре органической

химии Российского государственного педагогического университета им. А. Н. Герцена (Санкт-Петербург, Россия) для лечения последствий смоделированной патологии (ИГМ + НГ и ИГМ + ФТ). Исследуемые вещества разводили в физиологическом растворе таким образом, чтобы 0,1 мл раствора содержал исследуемую дозу на 100 г массы животного, и вводили внутривенно через 3 ч после перевязки второй сонной артерии и далее 1 раз в сутки в течение 7 дней. Подавление ИС животных осуществляли введением циклоспорина (препарат “Экорал”, Чехия) перорально в дозе 5 мг/кг ежедневно в первой половине дня [17]. Активировали ИС введением липополисахарида (ЛПС) (препарат “Пирогенал”, Россия) внутривенно в дозе 10 мкг/кг через день в первой половине дня [2]. Первое введение циклоспорина и ЛПС осуществляли за день до перевязки первой ОСА и далее на протяжении всего эксперимента, общее количество применений для циклоспорина составило 13, для ЛПС — 7.

Летальность и неврологический дефицит регистрировали спустя 12, 24, 48, 72 ч и 7 сут после перевязки ОСА. Неврологический статус животных определяли по шкале McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной [4]. После окончательного моделирования ИГМ через 3 и 7 сут лечения у животных определяли уровень мозгового кровотока (МК) в проекции средней мозговой артерии с помощью ультразвукового доплерографа “Минимакс-Доплер-К” (Санкт-Петербург, Россия) с использованием датчика с рабочей частотой в 25 Гц. Также через 3 и 7 дней после окклюзии ОСА у животных забирали кровь для определения уровня нейронспецифических белков — NSE (нейронспецифической енолазы) и МВР (основного белка миелина). Данные белки определяли в сыворотке крови методом твердофазного ИФА с использованием наборов фирмы “Cusabio-Rat” (Китай) на ИФА-комплексе фирмы Tecan (Австрия). Психоневрологическое состояние животных оценивали в тестах Rota-Rod [11] и “Открытое поле” [3]. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel и GraphPad Prism 5. Достоверность различия показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью критерия Фишера, хи-квадрата и рангового однофакторного критерия Крускала — Уоллиса, критерия Данна. Статистически значимыми признавали различия при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения в иммунном статусе животных влияли на течение и исход ИГМ. Так, в контрольной группе крыс с активированной ИС были зафиксированы наименьшая летальность (40 %, табл. 1) и неврологические отклонения ( $5,28 \pm 0,89$ ) (табл. 2), чем у контрольных животных с подавленным иммунитетом ( $p \leq 0,05$ ). Напротив, подавление ИС усугубляло течение ИГМ, что сопровождалось высокой летальностью

75 % (табл. 1) животных контрольной группы и развитием тяжелого неврологического дефицита у выживших крыс ( $8,10 \pm 0,76$ ) (табл. 2).

Во всех группах животных с церебральной ишемией, получавших в течение 7 дней нейроглутам и фенибут, показатель смертности (табл. 1) и неврологический дефицит (табл. 2) были меньше, чем у ишемизированных животных, получавших физиологический раствор ( $p \leq 0,05$ ). При этом у животных, получавших после окклюзии ОСА нейроглутам, смертность была одинаково низкой (20 %) при всех состояниях ИС, а неврологический дефицит через 7 дней после ОСА

был наименьшим (в среднем 2,22 балла) среди всех исследуемых групп.

При применении фенибута после окклюзии ОСА на фоне активированного иммунитета регистрировали 20 % умерших животных и минимальный балл неврологического дефицита ( $2,30 \pm 1,04$ ). Однако применение данного препарата в условиях интактной и подавленной ИС сопровождалось уже большей летальностью животных (33 и 40 %) и более высоким неврологическим дефицитом от ( $3,83 \pm 1,17$ ) до ( $4,33 \pm 1,24$ ) балла, соответственно.

Таблица 1. Летальность животных после необратимой окклюзии ОСА

Состояние иммунной системы	Группа животных	Время после окклюзии ОСА									
		12 ч		24 ч		48 ч		72 ч		7 сут	
		n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%	n/N	%
Интактная ИС	ЛО	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0
	ИГМ	4/20	20	5/20	25	6/20	30	<b>7/20<sup>#</sup></b>	35	<b>11/20<sup>#</sup></b>	55
	ИГМ + НГ	0/15	0	<b>0/15<sup>*</sup></b>	0	<b>1/15<sup>*</sup></b>	6,6	<b>1/15<sup>*</sup></b>	6,6	<b>3/15<sup>*</sup></b>	20
	ИГМ + ФТ	0/15	0	<b>1/15<sup>*</sup></b>	6,6	<b>1/15<sup>*</sup></b>	6,6	<b>2/15<sup>*</sup></b>	13,3	5/15	33,3
Подавленная ИС	ЛО	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	1/15	6,6
	ИГМ	4/20	20	6/20	30	<b>8/20<sup>#</sup></b>	40	<b>10/20<sup>#</sup></b>	50	<b>15/20<sup>#</sup></b>	75
	ИГМ + НГ	0/15	0	<b>1/15<sup>*</sup></b>	6,6	<b>1/15<sup>*</sup></b>	6,6	<b>2/15<sup>*</sup></b>	13,3	3/15 <sup>*</sup>	20
	ИГМ + ФТ	1/15	6,6	2/15	13,3	<b>3/15<sup>*</sup></b>	20	<b>3/15<sup>*</sup></b>	20	6/15	40
Активированная ИС	ЛО	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0
	ИГМ	3/20	15	4/20	20	5/20	25	<b>5/20<sup>^</sup></b>	25	<b>8/20<sup># ^</sup></b>	40
	ИГМ + НГ	0/15	0	0/15	0	2/15	13,3	2/15	13,3	<b>3/15<sup>*</sup></b>	20
	ИГМ + ФТ	0/15	0	1/15	6,6	<b>1/15<sup>*</sup></b>	6,6	<b>1/15<sup>*</sup></b>	6,6	<b>3/15<sup>*</sup></b>	20

**Примечание:** n — количество умерших животных; N — общее количество животных в группе; % — общая летальность животных; ЛО — ложнооперированная группа животных; ИГМ — группа животных с ИГМ, получавшая физиологический раствор; ИГМ + НГ и ИГМ + ФТ — группы животных с ИГМ, получавшие нейроглутам и фенибут соответственно. Здесь и в табл. 2, 3: различия достоверны при  $p \leq 0,05$  по сравнению с: <sup>#</sup> ЛО группой; \* группой ИГМ; ^ аналогичной группой с подавленной ИС.

Таблица 2. Неврологический дефицит у животных в баллах по шкале McGrow после необратимой окклюзии ОСА ( $M \pm m$ )

Состояние иммунной системы	Группа животных	Время после поэтапной окклюзии ОСА	
		72 ч	7 сут
Интактная ИС	ЛО	0,10 ± 0,05	0,03 ± 0,03
	ИГМ	<b>4,65 ± 0,91<sup>#</sup></b>	<b>6,08 ± 1,00<sup>#</sup></b>
	ИГМ + НГ	<b>1,83 ± 0,60<sup>*</sup></b>	<b>2,20 ± 1,05<sup>*</sup></b>
	ИГМ + ФТ	2,53 ± 0,80	3,83 ± 1,17
Подавленная ИС	ЛО	0,10 ± 0,10	0,67 ± 0,67
	ИГМ	<b>6,68 ± 0,77<sup>#+</sup></b>	<b>8,10 ± 0,76<sup>#+</sup></b>
	ИГМ + НГ	<b>2,33 ± 0,82<sup>*</sup></b>	<b>2,20 ± 1,05<sup>*</sup></b>
	ИГМ + ФТ	<b>3,23 ± 0,91<sup>*</sup></b>	<b>4,33 ± 1,24<sup>*</sup></b>
Активированная ИС	ЛО	0,07 ± 0,05	0,07 ± 0,05
	ИГМ	<b>4,15 ± 0,79<sup># ^</sup></b>	<b>5,28 ± 0,89<sup>#^</sup></b>
	ИГМ + НГ	<b>1,97 ± 0,85<sup>*</sup></b>	<b>2,27 ± 1,04<sup>*</sup></b>
	ИГМ + ФТ	<b>1,73 ± 0,62<sup>*</sup></b>	<b>2,30 ± 1,04<sup>*</sup></b>

Различия достоверны при  $p \leq 0,05$  по сравнению с аналогичной группой с интактной ИС.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что состояние ИС оказывает существенное влияние на последствия перенесенного острого НМК, вызванного двусторонней окклюзией сонных артерий. Эти результаты согласуются с литературными данными о том, что иммуносупрессия может усугублять течение инсульта [12] и ослаблять эффективность церебропротективной терапии, что мы увидели на примере фенибута. Однако нейроглутам оказал выраженное нейропротекторное действие при ИГМ независимо от иммунного статуса. Возможным объяснением такого действия нейроглутама может быть наличие у него иммуномодулирующей активности [6].

**“Открытое поле” и Rota-Rod тест.** О степени ишемического повреждения ГМ, его функциональном состоянии после окклюзии ОСА можно судить по изменению координации движений, мышечного тонуса и поведения животных. Поэтому на 7 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 соответственно). В тесте “Открытое поле” (ОП) регистрировали количество пересеченных квадратов и суммировали число заглядываний в норки и стоек (указывают на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность).

В тестах Rota-Rod и ОП у животных групп контроль-ишемия с окклюзией ОСА независимо от состояния ИС наблюдались нарушение координации движений и снижение мышечного тонуса, более низкая двигательная и ориентировочно-исследовательская активность, чем у животных группы ЛО. При этом наименьшие показатели в группе контроль-ише-

мия зафиксированы в условиях иммуносупрессии относительно значений, полученных при интактной и активированной ИС ( $p \leq 0,05$ ) (табл. 3).

Введение исследуемых веществ крысам в течение 7 дней после окклюзии ОСА оказало положительное влияние на все перечисленные выше показатели. При применении нейроглутама у животных с ИГМ при интактном и подавленном иммунитете в тесте Rota-Rod отмечено улучшение координации движений и сохранение большей мышечной силы, а в тесте ОП — большая двигательная и ориентировочно-исследовательская активность, чем у животных группы ИГМ + ФТ соответствующих серий ( $p \leq 0,05$ ).

Фенибут проявлял более выраженное терапевтическое действие у животных с активированным иммунитетом, где показатели координации движений и мышечной силы в Rota-Rod тест и активностей в тесте ОП были достоверно выше аналогичных показателей групп ИГМ + ФТ на фоне интактной и подавленной ИС ( $p \leq 0,05$ ).

**Нейронспецифические белки и нейротрофины.** Для оценки степени поражения нервной ткани при ишемическом ее повреждении были определены уровни нейронспецифической енолазы (NSE) и основного белка миелина (MBP) в сыворотке крови как маркеров повреждения нейронов и глии ГМ. NSE и MBP используются в качестве клинико-диагностических критериев в оценке поражения структур ГМ при НМК [1]. В ряде работ доказана зависимость уровня этих ферментов в крови от тяжести и прогноза инсульта [7].

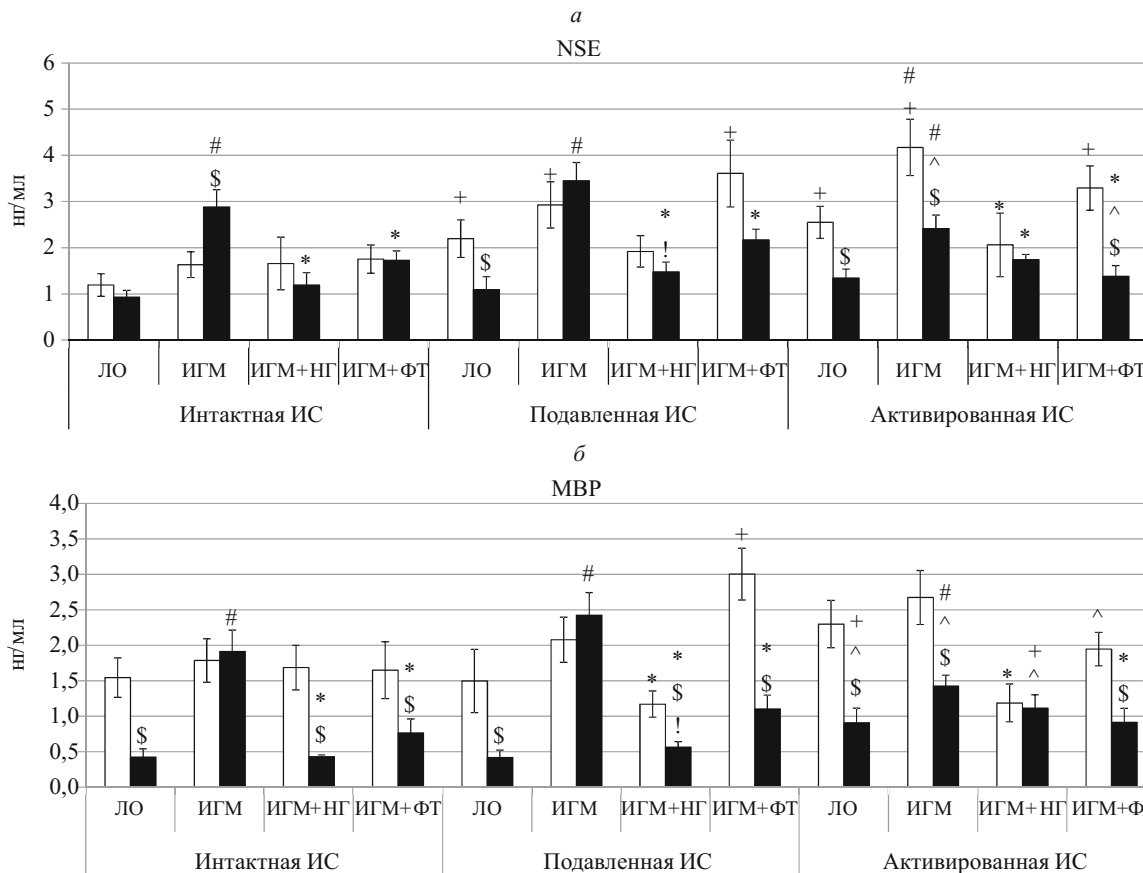
При общем анализе концентрации белков следует отметить, что уровни NSE и MBP на 3 день после окклюзии ОСА были примерно на одинаковом уровне у крыс во всех исследуемых группах, в том числе и у ЛО

Таблица 3. Поведение животных в тесте Rota-Rod и ОП через 7 дней после необратимой окклюзии ОСА ( $M \pm m$ )

Состояние ИС	Группа животных	Rota-Rod тест		ОП	
		ЛП первого падения, с	время удержания, с	ДА	ОИА
Интактная ИС	ЛО	38,1 ± 3,0	117,4 ± 5,9	29,1 ± 1,7	20,3 ± 1,4
	ИГМ	9,3 ± 0,9 <sup>#</sup>	29,9 ± 1,8 <sup>#</sup>	11,1 ± 1,3 <sup>#</sup>	6,3 ± 0,8 <sup>#</sup>
	ИГМ + НГ	28,1 ± 2,1 <sup>*!</sup>	82,3 ± 7,0 <sup>*!</sup>	19,5 ± 1,8 <sup>*</sup>	14,1 ± 1,7 <sup>*</sup>
	ИГМ + ФТ	16,6 ± 1,5 <sup>*</sup>	50,5 ± 4,2 <sup>*</sup>	14,2 ± 1,3	7,1 ± 1,1
Подавленная ИС	ЛО	32,7 ± 2,3	101,2 ± 8,5	25,2 ± 1,2 <sup>+</sup>	16,1 ± 1,6 <sup>+</sup>
	ИГМ	7,5 ± 0,9 <sup>#</sup>	24,3 ± 1,4 <sup>#+</sup>	6,3 ± 1,2 <sup>#+</sup>	3,6 ± 1,0 <sup>#+</sup>
	ИГМ + НГ	25,8 ± 1,2 <sup>*</sup>	73,8 ± 9,2 <sup>*</sup>	16,5 ± 1,8 <sup>*</sup>	12,9 ± 1,5 <sup>*</sup>
	ИГМ + ФТ	9,7 ± 0,9 <sup>+</sup>	36,3 ± 6,1	10,4 ± 0,7 <sup>*+</sup>	6,0 ± 0,6 <sup>*</sup>
Активированная ИС	ЛО	35,1 ± 2,7	119,9 ± 7,4	27,3 ± 2,0	18,5 ± 1,4
	ИГМ	11,3 ± 1,2 <sup>#^</sup>	44,1 ± 4,7 <sup>#+^</sup>	15,0 ± 1,5 <sup>#+^</sup>	4,5 ± 0,8 <sup>#</sup>
	ИГМ + НГ	27,3 ± 1,7 <sup>*</sup>	86,2 ± 8,4 <sup>*</sup>	18,2 ± 1,9	14,5 ± 1,5 <sup>*</sup>
	ИГМ + ФТ	23,7 ± 1,8 <sup>*+^</sup>	74,0 ± 3,2 <sup>*+^</sup>	16,3 ± 1,2 <sup>^</sup>	11,4 ± 1,3 <sup>*+^</sup>

Время удержания — суммарное время удержания на вращающемся стержне; ДА — двигательная активность (количество пересеченных квадратов); ОИА — ориентировочно-исследовательская активность (сумма стоек и заглядываний в отверстия).

Различия достоверны при  $p \leq 0,05$  по сравнению с: + аналогичной группой с интактной ИС; ! на 7 день лечения между группами, получавшими нейроглутам и фенибут.



**Рис. 1.** Содержание (а) NSE, (б) MBP в сыворотке крови через 3 и 7 дней после моделирования НМК ишемического генеза.

Здесь и на рис. 2: ЛО — ложнооперированная группа животных, ИГМ — группа животных с ИГМ, получавшая физиологический раствор; ИГМ + НГ и ИГМ + ФТ — группы животных с ИГМ, получавшие нейроглутам и фенибут соответственно. Различия достоверны при  $p \leq 0,05$  по сравнению с: # ЛО группой; \* группой ИГМ; + аналогичной группой с интактной ИС; ^ аналогичной группой с подавленной ИС; \$ — между 3 и 7 днем лечения в этой же группе; † — на 7 день лечения между группами, получавшими нейроглутам и фенибут; светлые столбцы — 3 день лечения, темные столбцы — 7 день лечения

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 день НМК у животных в условиях активации иммунитета, что вполне объяснимо наличием в период 3 дней после ишемического повреждения ГМ местного воспаления, и при общем активирующем действии липополисахарида мы имеем более напряженный воспалительный процесс.

Концентрация белков NSE и MBP на 7 сут после ишемического поражения ГМ была ниже, по сравнению со значениями 3 дня, за исключением групп животных с ИГМ, получавших физиологический раствор на фоне интактной и подавленной ИС, где повреждение нервной ткани прогрессировало. Следует отметить, что на 7 день НМК у животных группы контроль — ишемия именно при иммуносупрессии наблюдались самые высокие концентрации NSE и MBP, что достоверно выше показателей, зарегистрированных в условиях активированного иммунитета. 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. 1, а, б).

**NSE.** Через 7 дней НМК при применении исследуемых веществ в условиях интактной и подавленной ИС концентрация NSE снизилась относительно значений группы контроль — ишемия, что свидетельствует о меньшем поражении нейронов при ИГМ ( $p \leq 0,05$ ). Таким образом, при интактном иммунитете наименьший уровень енолазы наблюдался в группе ИГМ + НГ — 1,19 нг/мл, в группе ИГМ + ФТ несколько больше — 1,72 нг/мл (рис. 1, а). Аналогично и при иммуносупрессии наименьший уровень NSE наблюдался в группе ИГМ + НГ — 1,47 нг/мл, а в группе ИГМ + ФТ немного больше — 2,16 нг/мл. При сравнении эффектов нейроглутама и фенибута на 7 день НМК при иммунодепрессии оказалось, что достоверно меньший уровень NSE наблюдался при введении нейроглутама ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 1, а).

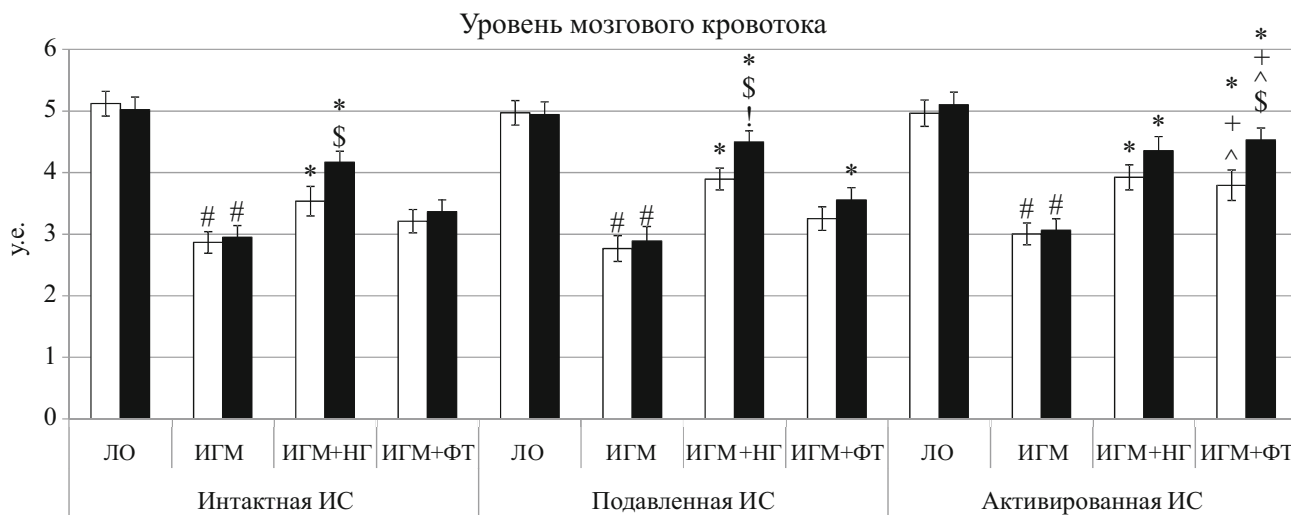


Рис. 2. Уровень локального МК через 3 и 7 дней после моделирования НМК ишемического генеза.

При активации иммунитета уже на 3 день после окклюзии ОСА у животных при применении нейроглутама отмечено снижение белка относительно группы контроль – ишемия (2,06 против 4,17 нг/мл) ( $p \leq 0,05$ ). А через 7 дней после НМК достоверный эффект получен при воздействии на ИГМ и нейроглутама, и фенибута, при этом наименьшая концентрация NSE достигнута у животных группы ИГМ + ФТ — 1,38 нг/мл, в группе ИГМ + НГ данного белка в крови было чуть больше — 1,74 нг/мл (рис. 1, а).

**МВР.** При интактном иммунитете к 7 дню НМК у животных, получавших в качестве терапии ИГМ исследуемые вещества, концентрация основного белка миелина была достоверно ниже значений у крыс контрольной группы. Наименьшее содержание МВР наблюдалось в группе ИГМ + НГ — 0,43 нг/мл, в группе ИГМ + ФТ несколько больше — 0,76 нг/мл (рис. 1, б).

На фоне иммуносупрессии уже через 3 дня после НМК положительный эффект достигнут в группе ИГМ + НГ, где уровень МВР составил 1,17 нг/мл, что ниже показателя группы контроль – ишемия — 2,08 нг/мл ( $p \leq 0,05$ ). Через 3 дня после окклюзии ОСА у животных, получавших фенибут, напротив, наблюдалось высокое содержание МВР относительно контроля, что также было достоверно больше уровня МВР, по сравнению с группой животных, получавших фенибут в условиях интактной ИС (рис. 1, б) Через 7 дней НМК в условиях иммуносупрессии применение исследуемых веществ достоверно снижало концентрацию МВР в крови, по сравнению со значением у крыс группы контроль – ишемия. Максимальный эффект был достигнут при введении нейроглутама, где зарегистрировано минимальное содержание МВР — 0,57 нг/мл ( $p \leq 0,05$ ), что было также достоверно меньше показателя крыс группы ИГМ + ФТ, где концентрация МВР составила 1,10 нг/мл ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 1, б).

В условиях активированного иммунитета на 3 день НМК при введении нейроглутама уменьшение концен-

трации МВР относительно контрольной группы было достоверным (1,19 против 2,68 нг/мл), а при применении фенибута незначительным. Следует отметить, что в случае с фенибутом данный показатель был значимо ниже по сравнению со значением в аналогичной группе при подавленной ИС. На 7 день НМК у крыс группы ИГМ + НГ концентрация МВР снизилась, но была выше по сравнению с животными аналогичной группы при интактной и подавленной ИС ( $p \leq 0,05$ ). Наилучший эффект при иммуноактивации через 7 дней после НМК достигнут у животных группы ИГМ + ФТ, где содержание МВР было минимальным — 0,91 нг/мл ( $p \leq 0,05$ ), тогда как при применении нейроглутама — 1,12 нг/мл (рис. 1, б).

Таким образом, при ИГМ повышенная концентрация NSE и МВР в сыворотке крови наблюдалась у крыс с наиболее выраженным неврологическим дефицитом, изменениями координации движений, мышечного тонуса и поведения.

Общая летальность животных после двусторонней перевязки ОСА и выраженность неврологического дефицита у выживших животных в значительной степени зависят от кровоснабжения ГМ.

**Уровень мозгового кровотока** в группах контроль-ишемия у животных с разным состоянием ИС практически не отличался и был значимо ниже групп ЛО соответствующих серий (рис. 2).

Через 3 и 7 дней после начала применения нейроглутама уровень МК при всех состояниях ИС был значительно выше, чем в группах контроль – ишемия ( $p \leq 0,05$ ) соответствующих серий, и к 7 дню наблюдалось его достоверное увеличение относительно показателей 3 сут при интактной и подавленной ИС. В свою очередь, фенибут через 3 дня применения увеличивал данный показатель только при активированном иммунитете, а через 7 — и при активированной, и при подавленной ИС ( $p \leq 0,05$ ). Важно отметить, что при иммуносупрессии нейроглутам восстанавливал МК на

26 % лучше по сравнению с фенибутом ( $p \leq 0,05$ ). На фоне активированной ИС МК в группах ИГМ + НГ и ИГМ + ФТ были сопоставимы, но степень его прироста к 7 сут была достоверно выше при применении фенибута (рис. 2).

В настоящее время существует широкий арсенал лекарственных препаратов, рекомендованных в терапии нарушений мозгового кровообращения, 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 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.

По данным различных литературных источников [12, 13], а также основываясь на результатах ранее нами проведенных исследований [16], мы отметили, что на развитие и исход патофизиологических процессов, вызванных ИГМ, значительное влияние оказывает состояние ИС организма. В связи с этим в данном исследовании была изучена нейропротекторная активность фенильных производных гамма-аминомасляной (фенибута) и *L*-глутаминовой кислоты (нейроглутама) при моделировании ИГМ на фоне интактного и измененного иммунитета животных. Полученные данные общей летальности, суммарного балла неврологического дефицита, показателей поведения животных, концентрации NSE и MBP и уровня МК позволяют сделать вывод, что терапия ИГМ нейроглутамом (фенильным производным *L*-глутаминовой кислоты) эффективна при всех состояниях ИС, а терапевтический эффект при применении фенибута более выражен при активированном иммунитете. Таким образом, результаты представленного исследования указывают на необходимость учета состояния ИС при острых НМК и более дифференцированного назначения церебропротекторных препаратов в клинических условиях, что, вероятно, повысит эффективность проводимой терапии.

## ВЫВОДЫ

1. ИГМ у животных на фоне подавленной иммунной системы протекает значительно тяжелее, чем при интактном и активированном иммунитете, о чем свидетельствует большая летальность (соответственно на 20 и 35 %,  $p \leq 0,05$ ), высокий балл неврологического дефицита в 1,3 ( $p \leq 0,05$ ) и 1,5 ( $p \leq 0,05$ ) раза выше, чем на фоне интактного и активированного иммунитета), меньшая двигательная и ориентировочно-исследовательская активность и мышечная сила, высокие концентрации в сыворотке крови нейронспецифических белков NSE и MBP. При активированной ИС все проявления ишемического повреждения ГМ выражены в меньшей степени (меньший неврологический балл и содержание NSE и MBP в сыворотке крови в среднем на 35 % ( $p \leq 0,05$ ), более высокие показатели координации движений, мышечной силы и локомоторной активности в среднем на 90 % ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с животными с иммуносупрессией.

2. Состояние ИС экспериментальных животных в значительной мере влияло на эффективность церебропротекторного действия фенильного производного ГАМК — фенибута при внутрибрюшинном введении в течение 7 дней после моделирования ИГМ в дозе 25 мг/кг. Фенибут оказывал наибольший нейропротекторный эффект при ИГМ на фоне стимулированной ИС и в меньшей степени — при иммуносупрессии, увеличивая выживаемость животных с активированным иммунитетом на 20 %, уровень МК на 27 % ( $p \leq 0,05$ ), сохраняя высокие показатели поведения животных ( $p \leq 0,05$ ) и снижая концентрацию NSE в сыворотке крови на 36 % ( $p \leq 0,05$ ).

3. Церебропротекторный эффект нейроглутама при внутрибрюшинном введении в течение 7 дней после окклюзии ОСА в дозе 26 мг/кг не зависел от состояния ИС крыс.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. И. Баканов, В. В. Алатырцев, О. В. Гончарова и др., *Рос. педиатр. ж.*, № 4, 19 – 23 (2003).
2. Э. А. Бардахчян, Н. Г. Харланова, *Патол. физиол. и эксперим. тер.*, № 1, 17 – 21 (1997).
3. Е. В. Волотова, Д. В. Куркин, Д. А. Бакулин и др., *Вестник Волгоградского гос. мед. университета*, № 1, 23 – 25 (2014).
4. И. В. Ганнушкина, *Ж. неврол. и псих. им. С. С. Корсакова*, № 1, 14 – 18 (1996).
5. Е. И. Гусев, М. Ю. Мартынов, П. Р. Камчатнов и др., *Consilium Med.*, 16(12), 13 – 17 (2014).
6. В. И. Петров, И. Н. Тюренков, В. В. Багметова и др., Патент РФ № 2429834, *Бюл. изобрет.*, № 27 (2011).
7. А. А. Спасов, В. Ю. Федорчук, Н. А. Гурова и др., *Ведомости научного центра экспертизы средств мед. применения*, № 4, 39 – 45 (2014).
8. И. Н. Тюренков, Б. Ю. Гумилевский, И. С. Филина и др., *Иммунология*, 35(5), 265 – 269 (2014).
9. И. Н. Тюренков, М. А. Самотруева, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 5, 536 – 539 (2009).

10. И. В. Фатеев, В. Н. Быков, С. В. Чепур и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **152**(9), 350 – 354 (2011).
11. M. Bohlen, A. Cameron, P. Metten, et al., *J. Neurosci. Methods*, **178**(1), 10 – 14 (2009).
12. A. Chamorro, J. Hallenbeck, *Stroke*, **37**, 291 – 293 (2006).
13. U. Dirnagl, J. Klehmet, J. S. Braun, et al., *Stroke*, **38**(2 suppl), 770 – 773 (2007).
14. C. Meisel, A. Meisel, *N. Engl. J. Med.*, **365**, 2134 – 2136 (2011).
15. S. De Raedt, A. De Vos, A. M. Van Binst, et al., *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **2**(2), e71 (2015).
16. I. N. Tyurenkov, B. Y. Gumilevsky, I. S. Filina, et al., *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **115**(9 Vypusk 2 Insul't), 23 – 29 (2015).
17. G. S. Zijlstra, J. Wolting, J. Prop, et al., *J. Heart Lung Transplant.*, **28**(5), 486 – 492 (2009).

Поступила 10.02.16

## NEUROPROTECTIVE ACTION OF PHENIBUT AND NEUROGLUTAM IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA ON THE BACKGROUND OF ALTERED IMMUNOREACTIVITY

E. V. Volotova, I. S. Filina, D. A. Bakulin, D. V. Kurkin, and I. N. Tyurenkov

Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

Cerebroprotective activity of phenyl derivatives of GABA (phenibut, 25 mg/kg) and L-glutamic acid (neuroglutam, 26 mg/kg) in rats with cerebral ischemia was studied on the background of intact and altered immunoreactivity. Tested compounds were administered intraperitoneally for 7 days after two phase ligation of common carotid arteries (second artery was ligated 3 days after ligation of the first artery). Immunosuppression caused by cyclosporin (daily dose 5 mg/kg, p.o., for 13 days) worsened brain ischemia outcome, as manifested by increased mortality, more severe neurological marker score, increased levels of brain damage markers (NSE and MBP) in the blood serum, decrease in muscle strength and locomotor activity, and impairment of orientation and research activity as compared to animals with brain ischemia and intact immunity. Activation of immune system was caused by lipopolysaccharide (10 mg/kg, i.p., 7 injections every second day). Upon activation of the immune system, brain ischemia produced lower mortality, while the survived rats exhibited more favorable outcome of ischemia than animals with suppression of immune system: lower neurological marker score, lower blood serum NSE and MBP levels (–35% on average,  $p < 0.05$ ), and much higher level of performance in motor coordination, muscular strength, and locomotor activity (+90% on average,  $p < 0.05$ ). The state of immune system significantly influenced the neuroprotective activity of drugs tested. Neuroglutam administration produced positive effect both in animals with intact immunity and on the background of altered immunoreactivity. However, most positive outcome after neuroglutam administration in ischemic rats was observed in animals with suppression of immune system, with significant increase in the cerebral blood flow level (+56%), decrease in NSE and MBP blood serum levels (57 and 76%, respectively) after 7-day treatment as compared to the control group. The therapeutic potential of phenibut was somewhat lower than that of neuroglutam, and it was more pronounced in rats with activated immune system, whereas the drug effectiveness in rats with suppressed immune system was less pronounced.

**Keywords:** ischemic attack; brain ischemia; immune system suppression; immune system activation; cerebral blood flow; neurologic impairment; behavioral impairment; NSE; MBP; phenibut; neuroglutam; rats.