

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

На правах рукописи

ЛИТВИНОВ АНДРЕЙ АНДРЕЕВИЧ

ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА СОЛЕЙ ГАММА-
ОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМА
ИХ ДЕЙСТВИЯ

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
член-корресподент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
ТЮРЕНКОВ ИВАН НИКОЛАЕВИЧ

ВОЛГОГРАД – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ОГЛАВЛЕНИЕ | 2 |
| ВВЕДЕНИЕ | 8 |
| ГЛАВА 1. Обзор литературы. | 13 |
| 1.1. Нарушение мозгового кровообращения как медико-социальная проблема. | 13 |
| 1.2. События, развивающиеся при нарушении мозгового кровообращения. . | 14 |
| 1.2.1. Глутаматно-кальциевый каскад. | 16 |
| 1.2.2. Метаболический лактат-ацидоз. | 20 |
| 1.2.3. Отек ткани головного мозга. | 20 |
| 1.2.4. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии ОНМК. | 22 |
| 1.3. Нейропротекция в патогенетической терапии ОНМК ишемического генеза | 27 |
| 1.3.1. Изучения солей гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК) в качестве церебропротекторных средств. | 29 |
| 1.3.1.1. ГОМК, функции, места связывания в мозге. | 29 |
| 1.3.1.2. Литий, физиологическая роль, нейропротекторные свойства. | 38 |
| 1.3.1.3. Магний, физиологическая роль, нейропротекторные свойства. | 41 |
| Глава 2. Материалы и методы. | 49 |
| 2.1. Методы экспериментального моделирования ишемического и травматического повреждения головного мозга животных | 51 |
| 2.2. Метод моделирования дефицита половых гормонов. | 55 |
| 2.3. Метод оценки неврологического дефицита у животных. | 56 |
| 2.4. Методы изучения противогипоксической активности соединений... | 61 |
| 2.5. Методы оценки поведенческого статуса, когнитивных и мнестических функций у животных. | 62 |
| 2.6. Методические подходы и способы регистрации уровня локального мозгового кровотока | 68 |
| 2.7. Методы изучения биохимических показателей. | 69 |

| | | |
|-----------------|--|-----------|
| 2.8. | Методы изучения основных параметров гемостаза крови..... | 71 |
| 2.9. | Метод определения постишемического отека головного мозга. | 74 |
| Глава 3. | Церебропротекторный эффект однократного профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты при необратимой окклюзии общих сонных артерий у крыс. | 76 |
| 3.1. | Влияние однократного профилактического введения различных доз исследуемых соединений на выживаемость животных, подвергшихся ишемии головного мозга, вызванной необратимой билатеральной окклюзией общих сонных артерий. | 76 |
| 3.2. | Влияние однократного профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность неврологического дефицита животных, подвергшихся необратимой окклюзии общих сонных артерий. | 78 |
| 3.4 | Влияние однократного профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность мнестического дефицита животных, подвергшихся необратимой окклюзии общих сонных артерий головного мозга. | 83 |
| 3.5 | Заключение. | 87 |
| Глава 4. | Церебропротекторный эффект однократного профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты при гравитационной ишемии головного мозга у крыс..... | 88 |
| 4.1 | Влияние профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выживаемость животных после преходящей ишемии головного мозга у крыс..... | 88 |
| 4.2 | Влияние профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность неврологического дефицита животных после преходящей ишемии головного мозга у крыс..... | 89 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3 Влияние профилактического введения различных доз солей гамма-оксималяной кислоты на выраженность поведенческого дефицита у животных после преходящей ишемии головного мозга у крыс..... | 92 |
| 4.4 Влияние профилактического введения различных доз солей гамма-оксималяной кислоты на выраженность мнестического дефицита у животных после преходящей ишемии головного мозга у крыс..... | 93 |
| 4.5. Заключение | 96 |
| Глава 5. Церебропротекторный эффект однократного лечебного введения солей гамма-оксималяной кислоты при моделировании травмы головного мозга у крыс..... | 98 |
| 5.1 Влияние лечебного введения солей гамма-оксималяной кислоты на неврологический статус животных при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс. | 98 |
| 5.2 Влияние лечебного введения солей гамма-оксималяной кислоты на сенсомоторный дефицит у животных, вызванный моделированием травматического повреждения головного мозга у крыс. | 102 |
| 5.2.1. Влияние лечебного введения солей гамма-оксималяной кислоты на сенсомоторный дефицит у животных в тесте «Сужающаяся дорожка» или «Balance-beam test». | 102 |
| 5.2.2. Влияние лечебного введения солей гамма-оксималяной кислоты на сенсомоторный дефицит у животных в тесте «Staircase test» | 104 |
| 5.3. Влияние лечебноого введения солей гамма-оксималяной кислоты на поведенческий статус животных при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс. | 105 |
| 5.4 Влияние лечебного введения солей гамма-оксималяной кислоты на мнестический статус животных при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс. | 107 |
| 5.5. Заключение. | 109 |

| | |
|---|------------|
| Глава 6. Церебропротекторный эффект курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на модели недостаточности половых гормонов с фокальной ишемией головного мозга у крыс..... | 110 |
| 6.1 Влияние лечебного курсового введения солей гамма-оксимасляной кислоты на неврологический статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс. | 110 |
| 6.2 Влияние лечебного курсового введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит у животных вызванный моделированием фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс. | 114 |
| 6.2.1. Влияние лечебного курсового введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит у овариоэктомированных животных в тесте «Сужающаяся дорожка» или «Balance-beam test»..... | 114 |
| 6.2.2. Влияние курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит у овариоэктомированных животных в тесте «Staircase test» »(Montoya и др., 1991)..... | 117 |
| 6.3. Влияние курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на поведенческий статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс. | 119 |
| 6.4 Влияние курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на мнестический статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс. | 121 |
| 6.5 Влияние курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс. | 124 |
| 6.6 Заключение. | 125 |
| Глава 7. Изучение вероятных механизмов действия солей гамма-оксимасляной кислоты на различных моделях гипоксического, | |

| | |
|--|-----|
| ишемического и травматического повреждения головного мозга у крыс. | 127 |
| 7.1 Изучение противогипоксического действия солей гамма-оксимасляной кислоты на моделях нормобарической и гемической гипоксии. | 127 |
| 7.2 Влияние профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты на показатели локального мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании ишемического и травматического повреждения головного мозга у крыс. | 130 |
| 7.2.1 Влияние введения солей гамма-оксимасляной кислоты на показатели локального мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов при моделировании ОСА. | 130 |
| 7.2.2 Влияние профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты на показатели локального мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании гравитационной ишемии головного мозга у крыс. | 133 |
| 7.2.3 Влияние профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс. | 136 |
| 7.3. Влияние профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты на биохимические показатели крыс при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс. | 137 |
| 7.3.1. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность процессов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в условиях отека головного мозга. | 138 |

| | |
|--|-----|
| 7.3.2. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на гемолиз эритроцитов в условиях травматического повреждения головного мозга. | 141 |
| 7.3.3. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на утилизацию глюкозы мозговой тканью в условиях травматического повреждения головного мозга. | 142 |
| 7.4. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на гемореологические показатели на фоне травматического повреждения головного мозга у крыс..... | 144 |
| 7.4.1. Изучение влияние введения солей гамма-оксимасляной кислоты на тромбоцитарный компонент гемостаза у животных с травматическим отеком головного мозга. | 145 |
| 7.4.2. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на плазменный (коагуляционный) гемостаз у животных с травматическим отеком головного мозга. | 147 |
| 7.5 Изучение противоотечного действия солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании ишемического и травматического повреждения головного мозга у крыс..... | 154 |
| 7.5.1 Изучение противоотечного действия солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании неполной ишемии головного мозга у крыс | 154 |
| 7.5.2 Изучение противоотечного действия солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании преходящей ишемии головного мозга у крыс | 156 |
| 7.5.3 Изучение противоотечного действия солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании отека головного мозга у крыс. | 157 |
| 7.5. Заключение. | 158 |
| Глава 8. Результаты и обсуждения. | 160 |
| Выводы. | 167 |
| Список литературы | 171 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Актуальность поиска новых фармакологических средств коррекции нарушений мозгового кровообращения предопределена наличием критически высоким удельным весом сосудистых заболеваний мозга в структуре общей заболеваемости и смертности населения, высокими показателями временной утраты трудоспособности и первичной инвалидизации [73]. По данным ВОЗ в 2013 году инсульт унес свыше 7,5 млн. жизней людей планеты, что составило 12% от всех смертей. Инсульт по-прежнему занимает 2 место среди основных причин гибели людей в мире [17]. Так, смертность от нарушений мозгового кровообращения (НМК) в России занимает 2–е место, уступая лишь кардиоваскулярной патологии и составляя в острой стадии инсульта около 35% случаев [33]. Наиболее распространенным и тяжелым по течению и своим последствиям сосудистым поражением мозга является инсульт, летальность при котором выше, чем при инфаркте миокарда, а перспективы восстановления трудоспособности весьма ограничены.

Существующий на сегодняшний день спектр лекарственных препаратов, применяемый в клинической неврологической практике, не способен в полной мере обеспечить решение проблемы терапии нарушений мозгового кровообращения. В связи с этим, представляется очевидной потребность в новых эффективных церебропротекторных средствах, которые могли бы улучшить прогноз заболевания, предупреждать развитие нейродегенеративных процессов мозга, улучшать качество жизни пациентов. В то же время такие препараты должны обладать низкой токсичностью, хорошим профилем переносимости и являться безопасными для пациентов при длительном применении.

С этой точки зрения представляют интерес соединения, созданные на основе естественных нейромедиаторов производных ГОМК, которые способны влиять на различные звенья патогенеза при ишемическом поврежде-

нии головного мозга. Соединения магния и лития оксибутираты по предварительным прогнозам являются перспективными для создания на их основе средств коррекции нарушений мозгового кровообращения. Так, исследования показали, что ГОМК проявляет нейропротекторные свойства на различных моделях ишемии [99; 134; 190, 203]. Помимо этого исследования последних десяти лет показали, что соединения лития и магния обладают нейропротекторными свойствами на некоторых моделях хронического и острого ишемического повреждения головного мозга [116; 219, 148, 235].

Это позволяет считать целесообразным углубленное изучение церебропротективных свойств у солей ГОМК в сравнении с уже существующими препаратами, широко применяемыми в клинической практике при терапии и профилактике нарушений мозгового кровообращения.

Цель исследования. Экспериментально обосновать применение магния оксибутирата для лечения острого нарушения мозгового кровообращения и травмы головного мозга.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние однократного профилактического введения различных доз магния, натрия и лития оксибутиратов на выживаемость животных и степень неврологического, когнитивного, поведенческого дефицита, при неполной и преходящей ишемии головного мозга.

2. Оценить влияние однократного профилактического введения различных доз исследуемых соединений ГОМК на уровень мозгового кровообращения и степень гидратации мозговой ткани при неполной и преходящей церебральной ишемии.

3. Изучить влияние однократного введения профилактического различных доз соединений ГОМК на вазодилатирующую функцию эндотелия при неполной и преходящей ишемии головного мозга.

4. Изучить влияние однократного профилактического введения различных доз соединений ГОМК на состояние животных на моделях нормобарической и гемической гипоксии.

5. Изучить влияние курсового лечебного введения доз соединений ГОМК оказывающих наиболее выраженное церебропротективное действие, на степень неврологического, когнитивного, поведенческого дефицита, при фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс.

6. Изучить влияние соединений ГОМК в дозах, оказывающих наиболее выраженное церебропротективное действие, на выживаемость животных и степень неврологического, когнитивного, сенсомоторного и поведенческого дефицита с травматическим отеком головного мозга.

7. Изучить возможный механизм церебропротективного действия исследуемых соединений при травматическом отеке головного мозга: влияние на вазодилатирующую функцию эндотелия, процессы перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной системы, гемореологические показатели, развитие постишемического отека мозга.

Научная новизна исследования.

Впервые выполнено сравнительное изучение церебропротективного действия солей ГОМК - магния, натрия и лития в различных дозах на моделях неполной, преходящей и фокальной ишемии головного мозга, моделях отека головного мозга и гипоксии у крыс.

Определена наиболее эффективная доза для церебропротективной активности соединения магния оксибутирата.

Впервые изучено влияние курсового лечебного введения магния, натрия и лития оксибутиратов в наиболее эффективных дозах при фокальной ишемии головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов у самок крыс на фоне недостаточности половых гормонов.

Впервые изучено влияние лечебного магния оксибутирата в наиболее эффективной дозе при отеке головного мозга, вызванного механическим по-

вреждением тканей мозга. Оценено их влияние на уровень мозгового кровотока, вазодилатирующую функцию эндотелия, неврологический, мнестический и сенсомоторный статус животных, состояние процессов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной системы, гемореологические показатели, антигипоксические свойства. Впервые показано, что магния оксибутират как средство противоишемической защиты мозга превосходит пикамилон, магния сульфат, пирацетам и кавитон.

Научно-практическая ценность работы

Тема диссертации является составной частью плана научно-исследовательской работы кафедры фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей Волгоградского государственного медицинского университета и утверждена на заседании Ученого Совета ВолгГМУ (Протокол № _____).

В ходе диссертационного исследования проведена сравнительная оценка церебропротективного действия различных доз солей ГОМК - магния, натрия и лития. Определены наиболее перспективные для дальнейшего изучения соединения. Полученные результаты по изучению церебропротективной активности указанных солей ГОМК обосновывают целесообразность их дальнейшего углубленного доклинического исследования с целью их клинического внедрения в качестве корректоров церебральных нарушений ишемического генеза.

Полученные в работе данные используются в учебном процессе на кафедре фармакологии, кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей ВолгГМУ, НИИ Фармакологии ВолгГМУ при целенаправленном поиске и синтезе химических соединений, обладающих церебропротективным действием.

Положения, выносимые на защиту

1. Магния, натрия и лития оксибутираты обладают церебропротективной активностью при неполной, преходящей ишемии, а также отеке-

набухании головного мозга крыс, оказывая действие сопоставимое с препаратом сравнения кавинтоном и превосходя таковое у магния сульфата, пикамилаона, пирацетама.

2. Соли ГОМК - магния, натрия и лития оксибутираты улучшают мозговой кровоток и вазодилатирующую функцию эндотелия мозговых сосудов, в условиях экспериментальной ишемии головного мозга, снижают выраженность психоневрологических, мнестических и сенсомоторных нарушений, проявляют антигипоксические свойства, коррегируют гемореологические показатели, повышают активность ферментов антиоксидантной системы.

Апробация работы

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 197 страницах машинописного текста, иллюстрирована 25 рисунками и 30 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», экспериментальной части (главы 3-7), обсуждения результатов, выводов, списка литературы, включающего 82 отечественных и 161 зарубежных источников.

ГЛАВА 1. Обзор литературы.

1.1. Нарушение мозгового кровообращения как медико-социальная проблема.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения в 2012 году сердечно-сосудистые заболевания являлись лидером по числу смертей среди неинфекционных заболеваний, и смертность при этом составила 17,5 миллионов человек. При этом инсульт унес свыше 7,5 млн. жизней людей планеты, что составило 12% от всех смертей. Инсульт по-прежнему занимает 2 место среди основных причин гибели людей в мире [17]. В РФ показатель смертности с разбивкой по возрасту от сердечно сосудистых заболеваний в 2012 году составлял для мужчин 760,9, для женщин - 394,7 на 100000 человек. Для обоих полов этот показатель в РФ составил в 2012 году 531,0. Таким образом, РФ занимает восьмое место по данному показателю во всем мире, что, безусловно, представляет собой огромную экономическую и социальную проблему для нашей страны. В частности, показатель смертности у мужчин превышает таковой по популяции РФ, и остается неизменным на протяжении 10 лет [64, 73].

Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) являются важнейшей медикосоциальной проблемой. Заболеваемость инсультом составляет 2,5 - 3 случая на 1000 населения в год, смертность - 1 случай на 1000 населения в год. Летальность в остром периоде инсульта в России достигает 35%, увеличиваясь на 12-15% к концу первого года после перенесенного инсульта [33]. Постинсультная инвалидизация занимает первое место среди всех причин и составляет 3,2 человека на 10000 населения. К труду возвращается 20% лиц, перенесших инсульт, при том, что одна треть заболевающих инсультом - люди трудоспособного возраста. Таким образом, в России инсульт ежегодно развивается у 400 - 450 тысяч человек, примерно 200 тысяч из них погибают. В стране проживает более 1 миллиона человек, перенесших инсульт, причем

80% из них являются инвалидами [45]. В связи с этим, ОНМК, несомненно, является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины.

Одним из наиболее эффективных методов лечения ОНМК является фармакотерапия, поэтому именно ее оптимизация является основной задачей современной фармакологии [45].

1.2. События, развивающиеся при нарушении мозгового кровообращения.

По сравнению с другими органами человеческого тела, головной мозг особенно чувствителен к ишемическому повреждению. Однако при внезапном ишемическом повреждении, наблюдаемом в других тканях, короткий период церебральной ишемии (в течение 10 минут) может привести к глубокому нейрональному повреждению, которое может быть обнаружено через несколько дней и будет прогрессировать в течение нескольких месяцев.

Церебральная ишемия является процессом, составляющим смысл метаболического этапа патогенеза ОНМК ишемического генеза, в основе которого лежат универсальные реакции мозговой ткани на повреждающие воздействия или изменений окружающей среды, в том числе нарушения обеспечивающих жизнедеятельность мозга сосудистых систем. [28]. Независимо от причины возникновения ишемии, ключевым элементом является формирование локального очага ишемии с формированием некроза. В этом случае формируется гипоперфузионный градиент, который ведет к активации процессов, так или иначе вовлеченных в процесс клеточного выживания или смерти [194]. Этому, как правило, предшествует цепь патобиохимических нарушений, тяжесть и скорость развития которых напрямую зависят от степени и продолжительности снижения мозгового кровотока в ткани [28; 61; 74; 34]. Однако в целом последовательность процессов выглядит следующим образом: в течение нескольких минут после ишемии активированная микроглия вызывает активизацию цитокинов и молекул адгезии. Через несколько часов до нескольких дней эндотелий сосудов отвечает мощным запуском ангиогене-

за. От нескольких дней и недель до месяцев на астроцитах происходит экспрессия GFAP (глиально-фибрилярного кислого протеина), которая приводит к образованию нейроглиального шрама; нейроны запускают процесс разветвления аксонов и разрастание дендритов [96].

Существует четыре критических уровня снижения мозгового кровотока, установленных экспериментально, которые определяют наступление основных метаболических и морфологических нарушений в поврежденной ткани [28]:

I критический уровень (уровень кровотока менее 60 мл/100 г ткани в мин) – происходит торможение белкового синтеза;

II критический уровень (уровень кровотока менее 35 мл/100 г ткани в мин) – формируется цитотоксический отек мозговой ткани;

III критический уровень (уровень мозгового кровотока менее 20 мл/100 г ткани в мин) – формирование метаболической недостаточности, за счет торможения синтеза АТФ, снижение функции активного транспорта ионов, выброс и накопление возбуждающих нейротрансмиттеров или стадия так называемой глутаматной эксайтотоксичности;

IV критический уровень (уровень мозгового кровотока менее 10 мл/100 г ткани в мин) – необратимое повреждение клеток, аноксическая деполяризация, формирование некроза.

Область мозга с уровнем мозгового кровотока, характерного для последнего критического уровня, становится необратимо поврежденной через 6-8 часов. Эта область окружена зоной, в которой кровоток в целом еще сохраняется на протяжении нескольких часов, так называемой зоной пенумбры, и поэтому там отсутствуют структурные повреждения. Таким образом, зона пенумбры представляет собой не только топографическую область, но и динамический процесс распространения биоэнергетических нарушений от ядра инфаркта к периферии [28]. Именно длительность существования пенумбры определяет «терапевтическое окно», период, когда проводимые лечебные

мероприятия могут оказать максимальную эффективность, который, однако, не имеет жестких временных границ.

Основным содержанием этого периода являются быстрые реакции глутамат-кальциевого каскада, которые определяют суть ишемического повреждения мозговой ткани, в связи, с чем эта стадия развития патологического процесса привлекает особое внимание исследователей и ученых.

1.2.1. Глутаматно-кальциевый каскад.

Концепция эксайтотоксичности была сформирована еще в 70х годах XX века и исходит из идеи о том, что нейротоксичные глутаматные аналоги структурно сходны, и эти молекулы могут вызвать нейротоксичность по сходному механизму, связанному с чрезмерным возбуждением в клетке [218]. Эта гипотеза подтверждается фактом корреляции возбуждающего и нейротоксичного эффектов у аналогов глутамата. Существует несколько типов ионотропных рецепторов, чувствительных к ВАК, в связи с этим, их классификация основана на различной чувствительности к действию производных органических кислот. Таким образом, выделяют NMDA, AMPA, каинатный и L-AP4 типы рецепторов. На сегодняшний день, основную роль в процессе глутаматно-кальциевого каскада отводят самым изученным NMDA рецепторам. Последние исследования показывают, что различия в функционировании NMDA рецепторов связаны с различием в их субъединичном составе [104]. Так, выяснилось, что активность рецепторов содержащих субъединицы GluN2B связана с клеточной смертью, а активация таковых, содержащих субъединицу GluN2A – с нейропротективным эффектом и дальнейшей выживаемостью клетки [218].

Затем в 80х годах была обнаружена связь глутаматных аналогов с ионами кальция, поток которых, предположительно являлся причиной смерти клеток.

Исходя из основной роли кальция в процессе глутаматного повреждения, нарушения механизмов гомеостаза кальция в клетке будут обострять пе-

перегрузку ионами кальция и усиливать нейротоксичность. К тому же исходный поток ионов кальция, который следует за глутаматной стимуляцией, является пусковым механизмом для формирования вторичной внутриклеточной кальцевой перегрузки, выраженность которой коррелирует с наступлением нейрональной смерти. [160]. Одним из важнейших регуляторов внутриклеточной концентрации кальция является мембранный натриево-кальциевый транспортер (NCX), который вытесняет ионы кальция из клетки, используя движущую силу потока ионов натрия. После глутаматной стимуляции этот транспортер частично восстанавливает физиологический уровень ионов кальция в клетке. Однако было показано, что NMDA-индуцированное нарушение функции NCX объясняет дальнейшую перегрузку клетки кальцием, которая следует за глутаматной стимуляцией, и замена дефектного NCX на неуязвимую изоформу предотвращает нейрональную эксайтотоксичную смерть клетки [94].

Также одну из основных ролей в поддержании кальциевого гомеостаза играет митохондрия. Она может восстанавливать внутриклеточную концентрацию кальция, как путем самостоятельного захвата большого количества кальция, так и путем содействия в АТФ-зависимом кальциевом оттоке. Под влиянием глутаматной стимуляции, митохондриальный захват приводит последовательно к образованию активных форм кислорода, открытию проницаемых пор, которое приводит к митохондриальной деполяризации [84], нарушение кальциевой регуляции и запуск нейрональной смерти [218]. Стоит заметить, что недавно разобщающие белки 2 и 3 были идентифицированы в качестве митохондриального кальциевого унипорта (MCU), генетический нокаут которого приводит к ингибированию митохондриального захвата кальция в ответ на глутамат и другие стимулы, предотвращая, таким образом, NMDA-рецепторную митохондриальную деполяризацию и последующую смерть клетки [197].

В развитие глутамат-кальциевого каскада выделяют три стадии: стадия индукции или запуска, стадию развития или амплификации и последняя стадия экспрессии, заканчивающаяся гибелью клетки.

Нарушение снабжение кровью участка мозга при ишемии ведет к снижению эффективности трансформации кислорода в глюкозу, и соответственно снижению энергетического потенциала, необходимого для функционирования мозговых клеток. В частности, нейроны становятся неспособны поддерживать трансмембранные ионные градиенты, необходимые для их функционирования и гомеостаза. Нарушается система активного ионного транспорта в результате снижения уровня нейронального АТФ и выключения системы Na^+/K^+ -АТФазы, который приводит к массивному входу в клетку ионов Ca^{2+} через агонист-зависимые кальциевые каналы, контролируемые рецепторами, которые активируются возбуждающими аминокислотами (ВАК) – глутаматом и аспартатом. Эта активация связана с их накоплением в синаптической щели в результате нарушения высокоселективных компенсаторных механизмов транспорта и метаболизма этих нейромедиаторов под действием ишемии.

В своей основе, глутаматная эксайтотоксичность быстро приводит к некрозу вследствие истощения пула АТФ, усиления потока Na^+ и воды, в то время как в зоне пенумбры, где повреждение оказало малое влияние, глутаматная эксайтотоксичность способствует развитию нейрональному апоптозу. Глутаматная эксайтотоксичность приводит к нарушению системы микротрубочек, кальциево-зависимой потере MAP2 (ассоциированный с микротрубочками протеин 2), способствует нарастанию дендритной дисфункции и приводит к почти полной потере дендритов в культуре корковых нейронов. Токсические концентрации кальция в цитоплазме клеток при ишемии формируются в результате высвобождения его из внутренних пузырьков путем физического повреждения митохондрий и эндоплазматического ретикулула или снижения функции транспортеров на их мембранах. Предполагается, что

Ca^{2+} , вышедший из эндоплазматического ретикулаума через IP3R, может проникнуть в соседнюю митохондрию, что приводит к высвобождению цитохрома С. Нарастание цитоплазматических концентраций Ca^{2+} вызывают череду нейротоксичных каскадов, включая разобщение электронного транспорта для синтеза АТФ, активацию и гиперстимуляцию ферментов, таких как кальпаины и других протеаз, протеинкиназ, нейрональных NO-синтаз, кальциневрина и эндонуклеаз [214].

В некоторых недавних исследованиях было обнаружено, что глутаматная эксайтотоксичность снижает число и длину дендритов, а также приводит к гиперфосфорилированию тау-белков [214]. Гиперфосфорилирование тау-белков является маркером нейродегенерации, которая приводит к нарушению пространственной памяти [107; 111]. На клеточном уровне, гиперактивация протеина GSK3 при ишемии связана с нарушением сборки микротрубочек, а активация RhoA с ретракцией актина цитоскелета [112]. Повреждение нейронального цитоскелета следует рассматривать как следствие утраты белкового транспорта и нейрональной стабильности при ишемии. Повреждение цитоскелета клетки приводит к белковому разрушению и агрегации после ишемии. Например, потеря активности белков семейства Rac далее усугубляет процесс нейродегенерации при ишемии, которая плотно связана с нарастанием когнитивных нарушений [140].

Стоит отметить, что именно на этом этапе особую значимость имеет выраженность дисбаланса между возбуждающими и тормозными нейротрансмиттерными системами, и формирующаяся таким образом недостаточность защитных механизмов. Таким образом, наряду с «эксайтотоксичностью» в патогенезе ОНМК ишемического генеза важную роль играет дефицит протекторных тормозных механизмов.

Второй этап каскада – апплификация – характеризуется продолжением распространения эксайтотоксичности и формированием, так называемой, «волны депрессии». Этот феномен является деструктивным событием, свя-

занным с практически полной деполяризацией мембран клеток и фазным спазмом мелких сосудов, который, так или иначе, ведет к увеличению очага инфаркта.

Последним этапом глутаматно-кальциевого каскада является стадия экспрессии, которая завершается смертью нейрона в результате кальмодулин-зависимой активацией ряда внутриклеточных ферментов: фосфолипаз, эндонуклеаз и протеинкиназ, и запуска процессов перекисного окисления липидов.

Таким образом, глутаматно-кальциевый каскад представляет собой реакцию мозговой ткани на ишемию, который приводит к образованию очага некроза. Несмотря на кажущуюся простоту, до сих пор этот деструктивный патологический каскад детально не изучен, а в основном выделены отдельные элементы, изучение взаимодействия между которыми позволит ближе подойти к решению проблемы регуляции этого процесса.

1.2.2. Метаболический лактат-ацидоз.

Снижение уровня макроэргического АТФ приводит к компенсаторной перестройке метаболизма по пути анаэробного гликолиза, который приводит к избыточному накоплению H^+ и снижению рН внутри клетки. В результате происходит «разрыхление» мембран клеток, с последующим повышением проницаемости сосудов, дополнительная секвестрация ионов Ca^{+2} , которая усугубляет течение оксидативного стресса. Кроме того, накопление в среде протонов водорода является фактором развития последующего клеточного отека. Таким образом, сопровождая глутаматно-кальциевый каскад, ацидоз усугубляет течение каждой его стадии, являясь при этом «патологической средой» для происходящих деструктивных процессов, как в клетке, так и вне ее.

1.2.3. Отек ткани головного мозга.

Отек головного мозга (ОНГМ) определяют как неспецифическая реакция ткани, характеризующаяся увеличением объема мозговой ткани вслед-

ствие возрастания содержания в ней воды [80]. Стоит отметить, что первичное формирование ОНГМ при ишемическом повреждении мозга происходит по типу цитотоксического отека, который представляет собой внутриклеточное накопление жидкости вследствие нарушения проницаемости клеточных мембран при сохранной проницаемости ГЭБ. Далее при длительной окклюзии сосуда ОНГМ прогрессирует, возникает повреждение мозговой ткани, происходит нарушение целостности ГЭБ и выход белков плазмы во внеклеточное пространство. Они повышают онкотическое давление и задерживают воду ввиду их высокой гидрофильности, что и приводит к формированию вазогенного отека головного мозга. В дальнейшем внеклеточное пространство увеличивается вследствие разрывов мембран клеток и выхода в него их содержимого, накопление продуктов метаболизма и клеточного распада увеличивает осмотическое давление и повторно увеличивает количество воды во внеклеточном пространстве. Также к основным факторам патогенеза относится сдвиг ионного обмена по обе стороны клеточных мембран, что обуславливает внутриклеточный отек, для которого в основном характерно набухание клеток мозга вследствие изменения активности мембранной Na^+/K^+ -АТФазы и регуляции транспорта воды.

В формирование ОНГМ вовлекается целый ряд нейромедиаторных систем. Так, в конце прошлого века целый ряд экспериментальных работ отметил особую роль холинергической [58], адренергической и дофаминергической систем [82]. Однако одной из ведущей роли в развитии ОНГМ принадлежит системе возбуждающих аминокислот (ВАК). Так, давно доказано высвобождение L-глутамата и L-аспартата в экстрацеллюлярное пространство при формировании ОНГМ [118]. Причем ВАК преимущественно активируют NMDA-рецепторы, что приводит к нейротоксическому эффекту, механизмы которого описаны выше.

Таким образом, ОНГМ, являясь самостоятельным патогенетическим событием при ишемическом повреждении головного мозга, его развитие тесно

связано со всеми факторами, усугубляющими процесс некротической смерти клеток.

1.2.4. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии ОНМК.

С развитием диагностической медицины нарушения адекватного функционирования сосудистого эндотелия обнаруживается у все более широких слоев населения. Так, установлено, что риск формирования сосудистых нарушений повышается у пациенток с перенесенной овариоэктомией и ранним климаксом, у пациентов с сахарным диабетом и ожирением. При этом именно эндотелиальная дисфункция является причиной большинства осложнений перечисленных выше примеров. Так у пожилых людей эндотелиальная дисфункция (ЭД) является одним из основных возрастных фенотипов, ответственных за развитие цереброваскулярных расстройств [123]. ЭД это результат снижения биодоступности оксида азота в процессе усугубления эндотелиального оксидативного стресса и воспаления, которые могут изменяться под влиянием традиционных рисков развития сердечно-сосудистых катастроф у пожилых пациентов [136].

В целом, NO это молекула, которая синтезируется из L-аргинина энзимом NO-синтазой (NOS), присутствующая в организме млекопитающих в трех изоформах: эндотелиальной (eNOS), нейрональной (nNOS) и индуцированной (iNOS). Локализация экспрессии и функция синтаз представлена в таблице 1.

NO-сигнальный путь играет одну из важнейших ролей в регуляции мозгового кровообращения в покое, стрессе и при физиологических нагрузках. В основе регуляции мозгового кровообращения в покое лежат два механизма - это ауторегуляция и нейро-сосудистой связи. Оксид азота, синтезируемый eNOS, играет основную роль при ауторегуляции, в то время как он же, синтезируемый nNOS, является важным в поддержании нейро-сосудистой связи.

Ауторегуляция это механизм, с помощью которого поддерживается неизменный уровень снабжения кровью тканей головного мозга, несмотря на

изменение перфузионного давления. NO, синтезируемый из eNOS, отвечает за нижний предел ауторегуляции так, что при нарушении механизма ауторегуляции через eNOS, происходит сдвиг гипотензивной части кривой церебральной ауторегуляции вправо. При патологических процессах, когда снижается мозговое кровообращение, например инсульт или внутричерепное кровоизлияние, истощение пула NO может в дальнейшем ухудшить состояние низкой перфузии и привести к нейрональным повреждениям.

Таблица 1.

Локализация и функция различных типов NOS в организме млекопитающих

| Тип NOS | Локализация экспрессии | Функции синтаз и оксида азота, синтезируемого этой синтазой | Литературный источник |
|---------|--|--|---|
| eNOS | Эндотелий мозговых сосудов, сосудистое сплетение в желудочках мозга | <p>Сохранение и поддержание церебральной микроциркуляции</p> <p>Ингибирование агрегации тромбоцитов; адгезии и миграции лейкоцитов</p> <p>Снижение пролиферации гладкой мускулатуры</p> <p>Снижение воспаления, ингибирование апоптоза</p> <p>Мобилизация клеток-предшественников, усиление нейроваскуляризации</p> <p>Модуляция функции синапсов в гиппокампе</p> | <p>Toda и др., 2009 [217]</p> <p>Srivastava K. и др., 2013 [213]</p> <p>Broos и др., 2011 [105]</p> <p>Toda и др., 2009 [217]</p> <p>Atochin D.N. и др., 2010 [92]</p> <p>Aicher A. и др., 2003 [87]</p> <p>Hopper R.A., 2006 [144]</p> |
| nNOS | Нейроны | <p>Поддержание нейрональной пластичности, регуляция кровообращения в нервных клетках, формирование памяти, передача болевого импульса</p> <p>Осуществление «нейро-сосудистой связи»</p> | <p>Schuman, E.M., 1994 [209]</p> <p>Toda, N., Okamura, T., 2003 [223]</p> <p>Attwell et al., 2010 [93]</p> |
| iNOS | Макрофаги, глиальные клетки, опухолевые клетки в ответ на провоспалительные цитокины и другие агенты | Формирование нейротоксичности после ишемического инсульта, травматическом повреждении головного мозга | <p>Iadecola C. и др., 1997 [145]</p> <p>Tisdall, M.M. и др., 2013 [221]</p> |

Механизм нейро-сосудистой связи это процесс, с помощью которого усиленная нейрональная активность связана с локальной регуляцией мозгового кровообращения. Это обеспечивает состояние, когда снабжение кислородом всегда больше потребности в нем, также известной как функциональная гиперемия. Это достигается интегрированной активностью нейронов, глиальных клеток и сосудов, которые образуют так называемую «нейро-васкулярную единицу» [93]. Нарушение этого механизма лежит в основе многих патологических состояний головного мозга. В исследованиях, где добивались нокаута или ингибирования pNOS, было показано, что кровоток, связанный с нейрональной активностью падал почти на 90% в мозжечке, однако этот процесс был обратим в присутствии экзогенных доноров NO [193]. Таким образом, NO-сигнальный путь является одним из значимых механизмов в регуляции процессов снабжения кровью жизненно-важных органов и регуляцию этого пути можно рассматривать в качестве одной из перспективных целей при разработке новых соединений с нейропротекторным действием.

Стоит также отметить, что важную роль играет усиление оксидативного стресса в эндотелиальных клетках с возрастом, что приводит к избыточному накоплению продуктов внутриклеточных энзимов, таких как NADPH-оксидазы и несвязанная eNOS, также как и в процессе митохондриального дыхания в отсутствии усиленной антиоксидантной защиты. Помимо этого конкретные заболевания и синдромы, а именно сахарный диабет, дислипидемия, ожирение и артериальная гипертензия усиливают повреждение эндотелиальных клеток. Патологический процесс запускает клеточные и функциональные нарушения в эндотелиальных клетках, которые, в результате дефицита NO, приводят к патологической вазорегуляции тонуса сосудов, активации воспаления и нарушении процессов коагуляционного гемостаза в эндотелиальных клетках [136]. Таким образом, эндотелиальная дисфункция явля-

ется одним из патологических процессов, который способен запускать и усугублять развитие цереброваскулярных расстройств.

Особое место занимает эндотелиальная дисфункция в развитии сердечно-сосудистых и других заболеваний у женщин в постменопаузальный период. Так, доказано, что половые гормоны у женщин, помимо функции развития и поддержания функционирования половых органов, обладают свойствами снижать риск сердечно-сосудистых заболеваний [90], обеспечивать нейрональную защиту в ЦНС [127] и нейрогенез в гиппокампе [131]. Однако при помощи каких механизмов изменения уровня гормонов яичников могут влиять на эндотелиальную функцию в перименопаузе у женщин пока неизвестно. Есть предположение, что эстрадиол предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции в части усиления высвобождения NO и регуляции сосудистого ответа у норадреналина и эндотелина-1, сверхпродукция которого также связана со снижением эластичности сосудов при гипертензии и атеросклерозе [191; 183]. Таким образом, наряду с основными факторами риска, постменопауза у женщин также является критическим периодом для возникновения ОНМК, что также необходимо учитывать в клинической практике.

Учитывая вышесказанное, церебральная ишемия является началом для формирования последовательных устойчивых гетерогенных деструктивных событий, которые образуют замкнутый патологический круг, сопряженный как с индивидуальными специфическими особенностями физиологии мозговой ткани, так и с множеством факторов, которые могут усиливать этот патологический процесс. В связи с этим терапевтические мероприятия при ОНМК должны осуществляться в соответствии с индивидуальным подходом к каждому пациенту. Однако до сих пор ни одна из предложенных таковых стратегий полностью не отвечает требованиям ни врачей, ни пациентов. Наряду с такими терапевтическими мероприятиями как поддержание жизненно-важных функций, тромболитическая и улучшение мозговое кровообращение, одну из важнейших мест занимает нейропротекция, способствующая

щая предотвращению развития, коррекции и профилактике осложнений у больных с ОНМК. Поэтому поиск нейропротекторного средства является одной из самых актуальных и амбициозных задач современной нейрофармакологии.

1.3. Нейропротекция в патогенетической терапии ОНМК ишемического генеза.

На сегодняшний день об ОНМК уже сформировалось четкое представление, как о неотложном состоянии, требующем быстрой и патогенетически обоснованной медицинской помощи с обязательным, наиболее ранним включением в терапию нейропротекторных средств [26; 50; 3; 53; 75].

Согласно методическим рекомендациям [52] базисная терапия при ОНМК включает:

1. Мероприятия, направленные на нормализацию функции внешнего дыхания и оксигенации;
2. Регуляция функции сердечно-сосудистой системы;
3. Контроль и регуляция гомеостаза, включая биохимические константы водно-солевой и кислотно-щелочной баланс;
4. Нейропротекция - комплекс универсальных методов защиты мозга от структурных повреждений - начинается на догоспитальном этапе;
5. Мероприятия, направленные на уменьшение отека головного мозга (имеют особенности в зависимости от характера инсульта);
6. Мероприятия по профилактике и лечению соматических осложнений: пневмонии, пролежней, уроинфекции, ДВС-синдрома, флеботромбозов и тромбоэмболии легочной артерии, контрактур и др.
7. Симптоматическая терапия, в том числе противосудорожная, психотропная, миорелаксанты и др.

В свою очередь в патогенетической терапии ОНМК ишемического генеза можно выделить:

1. Восстановление кровотока в зоне ишемии или реперфузионная терапия;
2. Поддержание метаболизма мозговой ткани и защиту ее от структурных повреждений или нейропротекторную терапию.

Реперфузионная терапия направлена на компенсацию сниженного мозгового кровотока и должна быть выполнена в первые минуты ишемического ОНМК. Однако она должна проводиться в условиях стационара, так как только там можно исключить наличие абсолютных противопоказаний для проведения реперфузии. Нейропротекторная терапия, таким образом, имеет ряд неоспоримых преимуществ, так как она доступна и относительно безопасна. Нейропротекцию определяют как какую-либо стратегию или комбинацию стратегий, которая противодействует, прерывает, или замедляет последовательность повреждающих биохимических и молекулярных событий, которые способны привести к необратимому ишемическому повреждению нейронов. Основная цель нейропротекторной терапии – это, в первую очередь, блокирование патогенетических процессов, поэтому каждый этап патологического каскада потенциально является мишенью данной терапии.

Выделяют первичную и вторичную нейропротекторную терапию. Первичная нейропротекция направлена на прерывание быстрых реакций глутамат-кальциевого каскада на этапе индукции. Она должна быть начата в первые минуты ОНМК и продолжаться до 72 часов.

Вторичная нейропротекция имеет цель снизить выраженность отдаленных последствий ишемического ОНМК. Ее место определяется с 3 часа после начала ишемического инцидента и вплоть до недели.

На сегодняшний день одна из основных проблем поиска нейропротекторных средств состоит в том, что клинические испытания средств, которые прошли экспериментальные исследования, как правило, завершаются выявлением неэффективности или серьезных побочных эффектов у исследуемых соединений. В связи с этим естественные нейромедиаторы представляют со-

бой перспективные соединения в качестве основы для создания эффективных и безопасных средств для терапии ишемического ОНМК.

1.3.1. Изучения солей гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК) в качестве церебропротекторных средств.

1.3.1.1. ГОМК, функции, места связывания в мозге.

ГОМК это загадочная молекула, которая была впервые синтезирована в 1960 году французским анестезиологом Н. Laborit в попытке создать проникаемую для гематоэнцефалического барьера форму тормозного медиатора ГАМК. Через три года Bessman и Fishbein сообщили о том, что ГОМК является эндогенным компонентом мозга млекопитающих, при этом является метаболитом ГАМК. С 1964 года ГОМК стала использоваться в качестве лекарства, так как она обладала ГАМК_A-миметической активностью. В 1982 году Maitre и соавторы опубликовали информацию о существовании высокоаффинных мест связывания в мозгу для меченной ГОМК, предполагая наличие специфичных ГОМК рецепторов [99]. До запрета в 1991 году ГОМК можно было встретить в продуктовых магазинах в США в качестве пищевой добавки. Даже после запрета в 1994 году на прилавках были прекурсоры ГОМК – гамма-бутиролактон и 1,4-бутандиол [180]. На сегодняшний день ГОМК в медицинских целях применяется в качестве средств при лечении нарколепсии, депрессии, алкогольной зависимости, эпилепсии и в качестве средства для наркоза. Немедицинское применение ГОМК в качестве наркотического средства, которое вызывает яркую эйфорию, распространено сейчас очень широко. Несмотря на это фармакотерапевтический потенциал ГОМК до сих пор до конца не раскрыт.

ГОМК представляет собой производное ГАМК и функционально проявляет себя в качестве нейромодулятора ЦНС, влияя при этом на функцию других нейротрансмиттерных систем, таких как дофаминергическая и ГАМК-ергическая системы. В естественных условиях ГОМК содержится в головном мозге млекопитающих в концентрациях от 0,3 до 2 ммоль/л. Из-

вестно, что введение крысам ГОМК в дозе 500 мг/кг внутривенно приводило через 2 часа к повышению уровня ГАМК [88], что говорит о взаимном метаболическом превращении этих двух соединений в головном мозге. ГАМК претерпевает трансаминирование в янтарный полуальдегид, который затем под действием янтарной полуальдегидредуктазы в присутствии НАДФ образует ГОМК [88]. Также ГОМК представляет собой один из промежуточных продуктов превращения ГАМК через нейроспецифическую метаболическую систему ГАМК-шунта, представляющую собой альтернативный путь превращения α -кетоглутарата в сукцинат [88]. Этот шунт представляет собой обходной путь для потоков субстратов цикла трикарбоновых кислот, и способен к существенной активации в условиях воздействия экстремальных факторов. При ишемическом повреждении в мозговой ткани происходит увеличение содержания ГАМК, это повышение также является следствием прироста внутриклеточного глутамата. По мере активации компенсаторных систем энергообеспечения содержание ГАМК снижается вследствие усиления ее утилизации в реакциях ГАМК-шунта. Таким образом, этот шунт представляет собой эффективный компенсаторный механизм распределения пулов и функцию субстратов в процессе метаболизма в мозговой ткани. По-видимому, от соотношения между потоками метаболитов, направляющиеся в своеобразные метаболические тупики, зависит степень повреждающего действия ишемии на мозг. Чем больше поток, проходящий через систему ГАМК и завершающийся накоплением ГОМК (в противоположность накоплению лактата), тем более вероятным становится восстановление утраченных мозговых функций в постишемический период благодаря защите мозга эндогенными нейропротекторами. Помимо этого для ГОМК и некоторых других монокарбоновых кислот существует специфичный транспортер МСТ1, который локализуется в мозговых эндотелиальных клетках и астроцитах, работающий по принципу протонного котранспортера, осуществляющий доставку ГОМК в клетки мозга [230].

Функционируя рядом с ГАМК в нейрональном синапсе, ГОМК полностью соответствует критериям нейротрансмиттера или нейромодулятора. ГОМК синтезируется из ГАМК в пресинаптическом нейроне как сказано выше. ГОМК переносится в везикулы через специальный транспортер, который также переносит ГАМК и глицин. Путем активации через кальциевозависимый механизм, ГОМК высвобождается в синаптическую щель, где может соединяться с несколькими мишенями. Выводиться ГОМК из синаптической щели путем натриево-зависимого плазменного транспортера [173].

В синапсах ЦНС, для ГОМК существуют как высокоафинные так и низкоафинные мишени (рис.1). Наиболее достоверно установлено, что ГОМК является низкоафинным частичным агонистом в миллимолярной концентрации для ГАМК_B рецептора. Однако эндогенные концентрации ГОМК, которые находясь на микромолярных уровнях, оказываются на несколько порядков меньше для активации ГАМК_B-рецептора. Соответственно активация этих рецепторов ГОМК характерно только при терапевтическом или рекреационном приеме.

Напротив, идентификация высокоафинных мест связывания оставалась неразрешенной на протяжении нескольких десятков лет. Предположение о наличии ГОМК-рецепторов было сформировано еще в конце прошлого века на основании описания высокоаффинных специфических мест связывания ГОМК в мозге у разных видов животных [100; 106]. Эти места связывания, часто называемые неуловимыми ГОМК-рецепторами, имели четкие различия с упомянутыми ГАМК_B рецепторами [121]. Успешное создание селективных высокоафинных аналогов ГОМК ускорило увлекательное раскрытие молекулярной структуры ГОМК-рецепторов. В 2003 Maitre и соавторы сообщили о клонировании «неуловимых» рецепторов из мозга крысы, а позже в 2007, из мозга человека [89]. Интересно, что оба белка не являются ортологичными, т.е. гены, кодирующие их синтез, не являются гомологичными и не произошли от одного предкового гена. Также эти белки не соотносятся с экспресси-

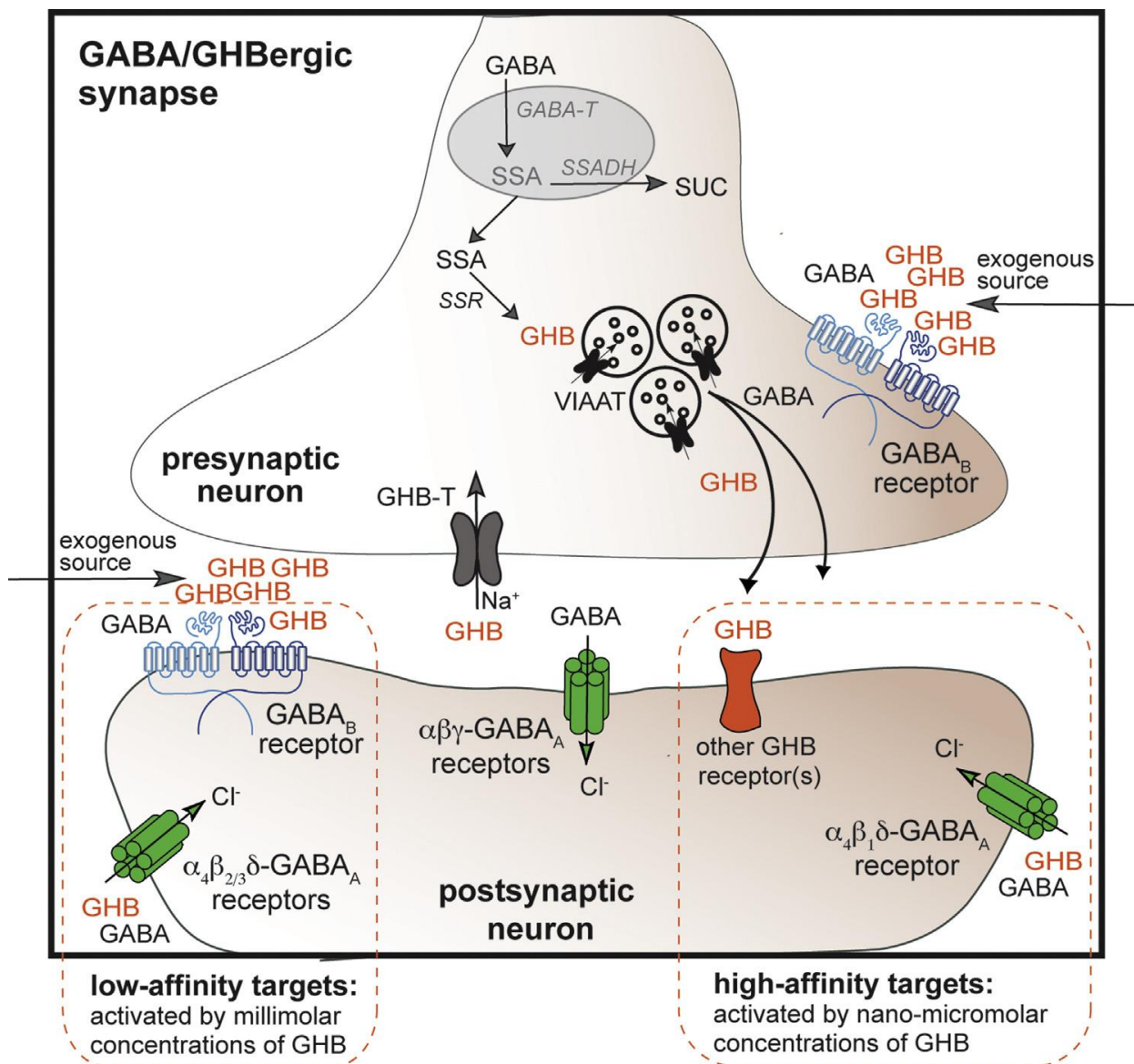


Рис.1. ГАМК/ГОМК-ергический синапс [99]. На рисунке показаны высоко- и низкоафинные места связывания для ГОМК, которые активируются как экзогенным так и синаптическим выбросом ГОМК. Метаботропные ГАМК_B-рецепторы и ионотропные α₄β₂δ и α₄β₃δ ГАМК_A-рецепторы активируются миллимолярной концентрацией ГОМК, достигаемой только после экзогенного попадания. «Неуловимые» высокоафинные места связывания ГОМК, часть из которых могут быть α₄β₁δ ГАМК_A-рецепторами, активируются ГОМК при уровне от наномолярных к микромолярным концентрациям.

Аббревиатуры: SSA-полуянтарный альдегид; SSADH - полуянтарный-альдегид-дегидрогеназа; SSR - полуянтарный-альдегид-редуктаза; SUC - сукцинат; GABA - γ-аминомасляная кислота; GABA-T - ГАМК-трансаминаза; GHB - γ-оксимасляная кислота; GHB-T - ГОМК-транспортер; VIAAT - везикулярный транспортер для тормозных нейромедиаторов.

ей высокоафинного места связывания и фармакологией ГОМК. И в 2012 году было показано, что $\alpha 4$ субъединица ГАМК_A-рецептора вовлекается в процесс высокоафинного связывания ГОМК [86], при этом ГАМК_A-рецепторы, содержащие $\alpha 4$ субъединицу могут обнаруживать при определенных условиях релевантность субпопуляции ГОМК рецепторов [126]. Однако первые исследования показывали, что тормозные эффекты ГОМК в substantia nigra не снимались бикикулином, однако в других исследованиях эффекты ГОМК и баклофена полностью ингибировались антагонистами ГАМК_B-рецепторов [110]. Таким образом, еще в 2009 году существовало стойкое убеждение, что влияние ГОМК на ГАМК_A рецепторы ограничивается, по-видимому, метаболическим превращением ее в саму ГАМК.

Еще в 1982 году высокоафинные места связывания меченой ГОМК были обнаружены во фронтальной коре, обонятельных луковицах, гиппокампе и стриатуме, которая не вытеснялась ГАМК и селективным агонистом ГАМК_B-рецепторов - баклофеном. При этом низкую афинность к ГОМК демонстрировали области мозжечка и другие органы [100]. Это в дальнейшем было подтверждено ауторадиографическим анализом со специфическими радиолигандами [233; 202].

Выше уже было отмечено, что при ишемическом повреждении головного мозга формируется нарастающий дисбаланс между тормозными и возбуждающими нейротрансмиттерными системами.

Этот дисбаланс в первую очередь связан с угнетением системы ГАМК, который проявляется уже в первые минуты формирования ишемического очага. ГАМК является главным тормозным нейротрансмиттером ЦНС, рецепторы которого широко распространены в структурах головного мозга, практически во всех нейрональных группах. Таким образом, потенциально ГОМК возможно может оказать влияние на систему ГАМК, приводя к ограничению возбуждающего стимула на пресинаптическом уровне – через ГАМК_B рецепторы, функционально связанные с потенциал-зависимыми

кальциевыми каналами пресинаптических мембран, и на постсинаптическом уровне через ГАМК_A рецепторы, функционально связанные с потенциал-зависимыми хлорными каналами [69].

Несмотря на отсутствие единого понимания механизма влияния ГОМК, на сегодняшний день накоплено множество экспериментальных исследований, касающихся влияния ГОМК на различные физиологические и биохимические процессы в норме и при патологии животных.

Так, с конца прошлого века как отечественными, так и зарубежными учеными активно проводятся исследования по выявлению фармакологических эффектов ГОМК *in vivo* в норме и на различных моделях ишемического повреждения мозга [16; 46; 51; 141; 172]. Так на модели ОСМА у крыс было показано защитное ГОМК, ГБЛ и 1,4-БД при ишемическом повреждении головного мозга [203]. После 2 часов после повреждения введение ГОМК снижало как гистологические, так и функциональные последствия фокальной ишемии при эксайтотоксическом повреждении мозга у крыс [190]. Предположительно основной функцией ГОМК при ишемии является предотвращение энергетических нарушений снижением церебрального метаболизма в острый период [224]. Также было показано положительное влияние введения ГОМК животным в постишемический период, так как в низких дозах ГОМК ускоряло нейронное восстановление и улучшало синтез белка [134]. Более ранние исследования показали, что ГОМК увеличивает кровоснабжение мозга и оказывает избирательное депримирующее действие на нервную регуляцию мозгового кровообращения, что выражается в угнетении констрикторных рефлекторных реакций сосудов головного мозга [43].

Клинические наблюдения указывают, ГОМК защищает нервные клетки от смерти. Так введение ГОМК эффективно дозозависимо защищало исходные и генетически модифицированные клетки от H₂O₂-индуцированной гибели. Интересно, что ГОМК, что сильно снижал повышенный уровень базального TUNEL-окрашивания, каспазы-3, и Вах / Bcl-2 в трансфекцирован-

ных клетках, а также противодействовал H_2O_2 -вызванному увеличению апоптических маркеров в исходных и генетически модифицированных клетках SH-SY5Y при ишемии [234].

Указывая выше на важную роль формирования ОНГМ в патогенезе ишемического ОНМК, особо следует упомянуть роль системы ГАМК в осуществлении регуляции водного гомеостаза в головном мозге у человека. Известно, что активность различных транспортеров и обменников определяет потенциал действия для иона Cl^- и соответственно потенциал реверсии. Транспорт ионов Cl^- осуществляется с помощью градиентов Na^+ и K^+ , формирующиеся за счет работы Na-K-АТФазы. Основными пассивными котранспортерами ионов Cl^- являются $Na^+-K^+-Cl^-$ - котранспортер (NKCC1) и K^+-Cl^- - транспортер 2 (KCC2). Наряду с другими ионными каналами и транспортерами ионов, $ГАМК_A$ рецептор также осуществляет регуляцию потоков ионов Cl^- в клетке (рис.2). Так если потенциал реверсии для ионов хлора больше мембранного потенциала, то открытие $ГАМК_A$ рецепторного канала приводит к выходу ионов хлора и последующей деполяризации клетки. И, наоборот, в случае если потенциал реверсии для Cl^- меньше мембранного потенциала, то ГАМК-эргические потоки приближают значение мембранного потенциала к гиперполяризации.

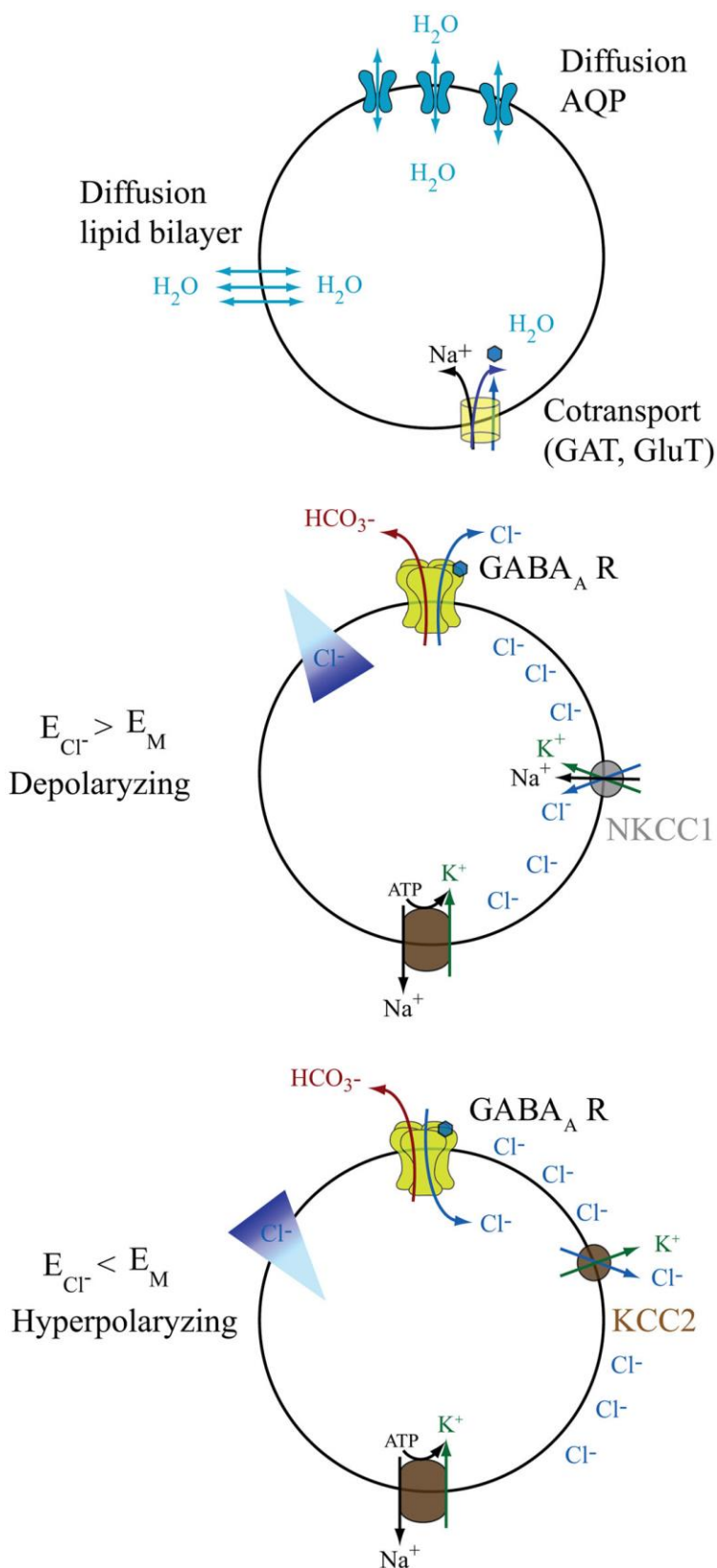


Рис. 2. Основные потоки воды и ионов в клетке [222]. Вода может диффундировать через липидную мембрану по градиенту осмотического давления, а также через специальные каналы аквапорины (AQP). Против градиента вода может перемещаться с помощью котранспортеров, таких же, как и для ГАМК и глутамата, которые используют Na⁺ для перемещения этих молекул. Представлены также процессы деполяризации и гиперполяризации - пояснение в тексте

Аббревиатуры: AQP - аквапорины, GAT - ГАМК-транспортер, GluT - глюкозный транспортер, GABA_AR - ГАМК_A-рецепторы, NKCC1 - Na⁺-K⁺-Cl⁻ - котранспортер, KCC2 - K⁺-Cl⁻ - транспортер 2, E_{Cl^-} - электрохимический градиент иона хлора, E_M - электрохимический градиент мембраны клетки.

Пока существует немного исследований, показывающих, что активация ГАМК_A рецепторов приводит к регулированию водного баланса в головном мозге [212,201], это в первую очередь связано как со сложностью в выделении эффектов ГАМК как нейротрансмиттера и как осмотического регулятора, а также с технической сложностью измерения изменения объема клеток *in vivo* и *in situ*. Тем не менее, существующие результаты исследований убедительно показали, что ГАМК-осмотическая регуляция может оказывать определенное влияние, как на клеточном, так и на системном уровнях [222]. Однако в конце прошлого века отечественными учеными Яснецовым В.С. и Новиковым В.Е. было показано позитивное действие производных ГАМК при различных видах отека набухания головного мозга [80]. Так, введение животным препаратов фенибут и натрия оксибутират достоверно тормозили развитие травматического повреждения головного мозга, причем эти свойства проявлялись уже на ранних стадиях формирования процесса. Кроме того, данные препараты оказывали влияние как на объем, плотность мозговой ткани, так и на энергетические процессы, происходящие на фоне повреждения. Так, после введения натрия оксибутирата (200 мг/кг) на фоне воспроизведенной травмы головного мозга животного происходило достоверное снижение концентрации АФМ и соотношение лактат/пируват. По сравнению с контролем в 2 раза уменьшалось содержание «избыточного лактата». Помимо этого натрия оксибутират достоверно повышал активность Mg-, Na,K- и общей АТФаз, скорость окисления в различных состояниях митохондрий, что говорит о повышении потенциальных возможностей их к усилению дыхания под действием препарата. Таким образом, ГОМК и ее производные, по данным литературы, являясь самостоятельным медиатором, а также производным ГАМК, проявляет доказанное влияние на патогенетические процессы, ограничивая развитие и тяжесть повреждения, как на молекулярном, так и на клеточном уровне.

1.3.1.2. Литий, физиологическая роль, нейропротекторные свойства.

Одним из способов создания лекарственных веществ является модификация уже существующих молекул, в частности замена неактивного аниона солей на таковой, проявляющий определенный фармакологический эффект. Известно, что такие ионы как Li^+ , Mg^{+2} , Zn^{+2} , K^+ способны изменять активность ряда ферментных систем, а также проявлять активность в отношении проницаемости определенных ионных каналов [39, 164]. Так в 1970 году в институте фармакологии АМН СССР был синтезирован лития оксибутират, который сочетал транквилизирующее действие ГОМК и антимианиакальные свойства лития. Этот препарат достаточно детально изучался, но широкого внедрения в клиническую практику он не нашел.

Исследования последних десяти лет показали, что литий обладает нейропротекторными свойствами на некоторых моделях хронического и острого ишемического повреждения головного мозга [117; 116, 219]. Так, в оригинальном исследовании, длительное профилактическое введение хлорида лития в терапевтических дозах снижало объем зоны инфаркта, сокращало количество клеток с апоптозом и улучшало поведенческий статус животных на фоне хронической ишемии головного мозга, вызванной ОСМА [186; 241]. В дальнейших исследованиях ученые показали, что подкожное введение лития в терапевтических дозах (0,5-3 мЭкв/кг) сразу после моделирования переходящей ОСМА достоверно снижает объем зоны инфаркта головного мозга животных, зону повреждения ДНК клеток, а также неврологический дефицит, определяемый по результатам сенсорных, двигательных и рефлекторных тестов [198]. Интересно, что положительные эффекты можно было наблюдать при введении лития, по крайней мере, через 3 часа после моделирования ишемии. Исследования последних лет показали, что нейропротекторный эффект лития в основном связан с ингибированием фермента гликоген-синтазакиназа-3 (GSK-3). Она представляет собой широко распространенный мультифункциональную серин-треониновую киназу, состоящую из α и β -

изоформ. Ее активность ингибируется путем фосфорилирования обеих субъединиц. GSK-3 может также ингибироваться литием путем прямого присоединения к каталитическому центру этого фермента [156], а также непрямым путем через активацию фосфорилирования при участии таких механизмов, как активация протеинкиназы А [153, 165], или фосфотидилинозитол-3-киназ-зависимую протеинкиназу В [113] и протеинкиназу С- α [154]. Вообще физиологически GSK-3 вовлечена в процессы нейронального развития, дифференцировки и старения в ЦНС млекопитающих. Однако постоянно накапливающиеся факты показывают, что GSK-3 также может играть роль проапоптотического фактора, и его дисфункция может быть вовлечена в патогенез нарушения настроения, шизофрении и многих неврологических расстройств [179; 152; 116]. Главную роль GSK-3 играет при формировании глутаматной эксайтотоксичности, вовлекаясь в процесс формирования нейрональной смерти при ишемическом ОНМК. Так, исследование на крысах показало, что преходящая ОСМА приводит к быстрой экспрессии цитоплазматической и ядерной GSK-3 в различных областях, как у молодых, так и у старых особей [204].

Сейчас литий активно применяют для лечения биполярных расстройств [178, 166]. Несколько последних исследований охватывают влияние лития на экспрессию генов, кодирующих стресс белки. Экспозиция 0,5 ммоль/л лития карбоната на культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y в течение периода от 25 до 50 недель приводило к изменению экспрессии некоторых генов и пост-трансляционной модификации белков стресса в этих клетках [200]. Так, было выявлено достоверное снижение экспрессии пируваткиназы-2, фермента, усиливающего как использование гликолитических промежуточных продуктов для макромолекулярного биосинтеза, а также рост раковых опухолей и кальмодулина-3, который является вторичным мессенджером в клетке. При этом уровни экспрессии ферментов, активность кото-

рых связаны с выживанием клеток нейронов, казеин-киназы II, тирозин/тирозин-фосфатазы-7 и дофамин-β-гидроксилазы увеличивались [185].

По-видимому, нейропротекторный эффект лития охватывает разнообразные механизмы. Как было указано выше, профилактическое введение лития активно предотвращало развитие когнитивного дефицита, связанного со снижением исследовательской активности у животных и повреждением памяти, вызванного ишемией [102]. Эти эффекты связывают в первую очередь с увеличением числа жизнеспособных клеток и, соответственно, снижением количество апоптотических клеток в поле CA1 гиппокампа у грызунов. Есть сведения, указывающие на то, что литий способен ингибировать гиперактивированные NMDA-рецепторы путем предотвращения фосфорилирования и последующей активации субъединицы 2A этого рецептора [170]. На неонатальной гипоксическо-ишемической модели были показаны противовоспалительные свойства лития. Лечение на этапе после формирования ОНМКа достоверно снижал потерю тканей при гипоксии-ишемии, и этот положительный эффект лития был связан с предотвращением активации микроглии и снижением уровней провоспалительных цитокинов [163].

В статье Fukumoto представлены доказательства, что длительное введение лития животным повышало экспрессию нейротрофического фактора мозга (BDNF) [130]. Являясь одним из важнейших нейротрофинов, BDNF необходим для развития коры мозга, синаптической пластичности и нейрональной выживаемости [108, 238]. На основании этого тезиса, высказано предположение, что это регулирование литием уровня BDNF и соответствующая активация тирозин-киназного рецептора (TrkB) играет важную роль в проявлении нейропротекторного эффекта. В подтверждении этого De-Maw Chuang и др [165] обнаружили, что нейропротекторный эффект лития блокируется ингибитором TrkB рецептора, K252a, или путем нейтрализации антител против BDNF и имитируется введением экзогенного BDNF в корковые нейроны животных. На модели повреждения оптического нерва было обна-

ружено нейропротективное действие лития хлорида в дозе 60 мг/кг путем увеличения уровня BDNF в сетчатке глаза [181].

Таким образом, на сегодняшний день накоплено достаточное количество данных о том, что литий обладает нейропротекторными свойствами как на клеточных, так и на моделях *in vivo*. Эти свойства обоснованы ингибированием фермента GSK-3, который связан с проявлением глутаматной эксайтотоксичностью в условиях ишемии. Также, индукция BDNF и активация BDNF-TrkB сигнального пути является предпосылкой для нейропротекторного применения соединений лития. Важно, что применение лития нивелирует неврологический дефицит, и улучшает функциональное восстановление. Оптимальное терапевтическое время воздействия составляет, по крайней мере, 3 часа после ишемического воздействия.

1.3.1.3. Магний, физиологическая роль, нейропротекторные свойства.

Помимо лития, в качестве нейропротекторных агентов уже с конца прошлого века активно используются соединения магния. Ионы магния являются вторым по распространенности после ионов калия, они вовлечены в более чем 600 ферментативных реакций, включая синтез белка и энергетический метаболизм. Магний влияет на регуляцию биохимических процессов в организме через магнийсодержащие ферменты и свободные ионы магния, являясь кофактором многих ферментативных реакций (гидролиз и перенос фосфатной группы, функционирование $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ насоса, $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ насоса, протонного насоса, участвует в обмене электролитов, гидролизе АТФ, уменьшает разобщение окисления и фосфорилирования, регулирует гликолиз и окисление жирных кислот; участвует в биосинтезе белка, передаче генетической информации, синтезе циклического АМФ и синтезе оксида азота в эндотелии сосудов) [150].

Магний оказывает тормозящее воздействие на проведение нервного импульса, входит в состав многочисленных ферментов нервной и глиальных тканей, участвует в процессах синтеза и деградации нейромедиаторов (нора-

дреналин, ацетилхолин), а также в регуляции нервно–мышечной активности проводящих тканей организма (сердечная мышца, скелетная мускулатура, гладкие мышцы внутренних органов). Ионы Mg^{+2} являясь физиологическими антагонистами ионов Ca^{+2} , конкурируют с ними за соответствующие кальциевые каналы, и препятствуют их поступлению через пресинаптическую мембрану [150]. Долгое время в клинической практике магния сульфат с особым успехом использовали для лечения преэклампсии, который снижал риск конвульсивной эклампсии на 50% [125, 236].

Также, в некоторых работах кафедры фармакологии ВолгГМУ под руководством профессора Спасова А.А. было установлено, что дефицит магния в организме индуцирует в организме развитие воспалительных реакций, дисфункции эндотелия и окислительного стресса – важнейших механизмов, вовлеченных в патогенез поражения кровеносных сосудов, что также является одним из факторов риска при ОНМК [30, 76].

Экспериментальные исследования магния в качестве нейропротектора при фокальной ишемии достаточно ограничены. Однако немногочисленные исследования показывают, что магний оказывает сложный комплексный нейропротективный эффект. Так, физиологическая внеклеточная концентрация магния (250 - 1000 ммоль/л) ингибирует высвобождение глутамата, потенцирует аденозино-зависимое ингибирование высвобождение глутамата, восстанавливает целостность гематоэнцефалического барьера, снижает выраженность отека мозга и неконкурентно препятствует активации NMDA рецепторов через блокаду потенциал-зависимых кальциевых каналов [114]. На моделях повреждения головного мозга у животных, внутриклеточный магний связан с изменением церебрального энергетического метаболизма и снижением функционального состояния митохондрий. В итоге, конкурируя с кальцием за место на потенциал-зависимых кальциевых каналах во внутриклеточном пространстве и на поверхности мембран клеток и являясь антагонистом N-, L- и P-типов кальциевых каналов, магний препятствует нарастанию

потока кальция в клетки нейронов при ишемии и предотвращает определенный путь к смерти клетки [114]. Магний обладает вазоактивными свойствами, которые способствуют улучшению мозгового кровотока через взаимодействие с васкулярной сетью, а также оказывает более отдаленные позитивные эффекты через сердечное и системное кровообращение. В сети церебральных сосудов магний ингибирует прямое влияние на крупные, средние и мелкие сосуды путем нивелирования эффектов эндотелина-1, нейропептида Y и ангиотензина II. У кроликов, ингибирование L-типов каналов кальциевых каналов на гладкой мускулатуре сосудов при введении магния, предполагает его потенциальную роль в предотвращении вазоспазма [208]. Внутривентриальное введение $MgCl_2$ после воспроизведения ОСМА у крыс достоверно снижало зону некроза [148]. В другом исследовании при введении 5% $MgSO_4$ в дозе 90 мг/кг крысам с воспроизведенной аутологичной тромбоэмболией СМА улучшало неврологические показатели через 6 часов [243]. Еще одно исследование было в основном направлено на выявление сывороточных концентраций магния у крыс с 90-минутной ОСМА с введением $MgSO_4$ до ишемии [235]. Было обнаружено, что уровень сывороточной концентрации для магния, выше которого выявлялись кардиодепрессивные эффекты, составил 3 ммоль/л. Причем в среднем объем инфаркта сокращался на 42%. В другом исследовании практиковали преишемическое внутриартериальное болюсное введение $MgSO_4$ [174]. Введение в более высоких дозах и снижение продолжительности ишемии приводило к снижению объема зоны инфаркта до 60%. Сравнительное экспериментальное изучение нимодипина и магния сульфата на региональный мозговой кровоток показало, что магния сульфат, в отличие от нимодипина, достоверно повышал кровоток в зоне инфаркта после ОСМА у крыс [115]. Также существует достаточно много исследований проясняющих вероятные механизмы действия магния, это в первую очередь неспецифический антагонизм в отношении всех подтипов потенциал-зависимых кальциевых каналов [147], неконкурентная блокада NMDA-

рецепторов [142], пресинаптическое торможение высвобождения глутамата [211], потенцирование действия аденозина, ускорение восстановления клеточного метаболизма после повреждения и связывание митохондриального кальция [132].

Стоит отметить, что существует большое количество клинических исследований эффективности соединений магния (Таб.2). Исследование IMAGES показало отсутствие достоверной эффективности при 12-ти часовом терапевтическом окне, при определенной пользе при применении при лакунарных ОНМК. В пилотном исследовании FAST-MAG не было выявлено каких-либо побочных эффектов при введении магнезии в полевых условиях [205]. В основу этого исследования легли предположения о достаточно длительном периоде включения пациентов в исследование IMAGES. В связи с этим в исследовании FAST-MAG уже более 1000 пациентов было рандомизировано в полевых условиях, 70% из которых получили лечение уже в первые часы после первых симптомов. Исследование продолжается и является одним из самых быстрых по скорости включения пациентов с ОНМК клиническое исследование, чем аналогичные проводившиеся до этого. Однако некоторые исследования показывают тренд на снижение смертности, улучшение состояния пациентов и снижение неврологического дефицита в послеоперационном периоде, что, безусловно, говорит о наличии у магния нейропротекторного эффекта и необходимо проведение дальнейших исследований.

Таблица. 2. Некоторые клинические исследования эффективности соединений магния при ОНМК [196; 114]

| Исследование (авторы) | Количество пациентов (А/К) | Дизайн | Соль магния | Схема введения препарата (терапия в первые сутки инсульт) | Данные на выходе |
|------------------------------------|----------------------------|---|-------------------|---|--|
| Galeas и др., 1999 [132] | 510/277 | Рандомизированное, плацебо-контролируемое, одно-центровое | Магния аспарат | 2,2 г в день | Лечение магнием улучшало показатели выживаемости и состояния на 30 и 90 дни |
| LampI и др., 2001 [162] | 22/19 | Рандомизированное, двойное-слепое, плацебо-контролируемое | MgSO ₄ | 4 г нагрузочная доза через каждые 15 минут, затем 35 г через 24 часа в течение 5 дней | Лечение магнием имело позитивный эффект у пациентов на выходе |
| IMAGES 1984 [146] | 25/26 | пилотное | MgSO ₄ | 2 г через 15 минут после инсульта + 7,8 г через 24 часа | Лечение безопасное |
| IMAGES 2004 [146] | 1188/1198 | 3 фаза исследования. Рандомизированное, мультицентровое двойное-слепое, плацебо-контролируемое, | MgSO ₄ | 2 г через 15 минут + 7,8 г через 24 часа | Не снижает достоверно смертность или нетрудоспособность, хотя может быть эффективна при лакунарных инсультах |
| Saver и др., (FAST-MAG 2004) [205] | 20/25 | Пилотное исследование. Открытое, нерандомизированное | MgSO ₄ | 2,5 г нагрузочная доза через 10 минут в полевых условиях, затем 1,5 г по прибытии в госпиталь, затем 16 г через 24 часа | Лечение безопасно и режим введения осуществим |
| FAST-MAG, 3 фаза ис- | 821 | Рандомизированное, мультицентровое, | MgSO ₄ | 4 г болюс в полевых условиях, затем 16 г инфузии через | Исследование продолжается |

| | | | | | |
|------------------------|------|---|-------------------|--|--|
| следования, 2008 [216] | | двойное-слепое, плацебо-контролируемое | | 24 часа | |
| Lees и др., 2011 [157] | 2589 | Рандомизированное, двойное-слепое | MgSO ₄ | Острый инсульт: болюсное введение 4г через 7часов+16г инфузия | Позднее введение магния не приводит к снижению смертности или инвалидности |
| IMASH [237] | 327 | Рандомизированное, двойное-слепое, плацебо-контролируемое | MgSO ₄ | Ишемия при субарахноидальном кровоизлиянии: среднее время введения 31,7 часов 9,5 г в день, 14 дней | Введение магния не приводило к желаемым результатам |
| MASH-2 [124] | 1204 | Рандомизированное, двойное-слепое, плацебо-контролируемое | MgSO ₄ | Ишемия при субарахноидальном кровоизлиянии: среднее время введения 33 часа 7 г в день, 20 дней | Введение магния не приводило к желаемым результатам |
| B-CPR TRIAL [168] | 300 | Рандомизированное | MgSO ₄ | Глобальная ишемия мозга после омпановки сердца: болюсное введение 2г перед госпитализацией | Потенциально магний показал признаки улучшения у пациентов после пробуждения |
| ACTOMg-SO4 [120] | 1047 | Рандомизированное, плацебо-контролируемое | MgSO ₄ | Предродовая гипоксическо-ишемическая энцефалопатия плода: роженицам в предродовом периоде 4г болюсное введение+ 1г/ч инфузия | Магний показал тренд снижения смертности и церебрального паралича, снижал моторные нарушения |
| PREMAG [175] | 573 | Рандомизированное, плацебо-контролируемое | MgSO ₄ | Предродовая гипоксическо-ишемическая энцефалопатия плода: роженицам в | Введение магния не приводило к снижению смертности плода |

| | | | | | |
|--------------------------|-----|--|-------------------|---|---|
| | | | | предродовом периоде 4г болюсное введение | |
| Bhudia SK, 2006 [101] | 350 | Рандомизированное, плацебо- контролируемое | MgSO ₄ | Оперативная ишемия при шунтировании на сердце: 780 мг болюсное введение + 3,16г инфузия | Введение магния снижало послеоперационный неврологический дефицит |
| Mack WJ, 2009 [171] | 108 | Рандомизированное, плацебо- контролируемое | MgSO ₄ | Оперативная ишемия при каротидной эндартериэктомии: 2 г болюсное введение + 8 г инфузия | Магний снижал послеоперационный неврологический дефицит |

Таким образом, согласно современным представлениям о ведении пациентов с ОНМК, терапия должна начинаться как можно раньше, а таковые мероприятия должны осуществляться еще в полевых условиях, так как именно успех этого этапа определяет дальнейшую судьбу пациента. В связи с этим поиск препарата, который уже на раннем этапе позволит предотвратить развитие тяжелых последствий ишемического повреждения головного мозга, является актуальной задачей. На сегодняшний день продолжается активные клинические исследования множества препаратов, призванных обеспечить качественную помощь больным с инсультом. И по-прежнему возможность оказывать влияние на патологические процессы с использованием эндогенных веществ, которые проявляют минимальные побочные эффекты, приводит к разработке перспективных соединений на основе естественных нейромедиаторов. Однако до сих пор задачи первичной нейропротекции у больных с инсультом остаются нерешенными, так как существующие стандарты терапии не лишены недостатков. В связи с этим поиск новых эффективных и безопасных нейропротекторов в ряду ГОМК-эргических соединений остается актуальным, что и послужило целью нашего исследования.

Глава 2. Материалы и методы.

Исследование выполнено на 528 среднеактивных крысах линии Wistar массой 180-220 г. и 300 беспородных мышах массой 12-20 г, содержащихся в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Эксперименты проводились в соответствии с рекомендациями Комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздравсоцразвития России, Рекомендациями ВОЗ, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)», а также ГОСТу 3 51000.3-96 и 5100.4-96, правилами GLP, Приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики РФ», Правилами лабораторной практики (СЕР) при проведении доклинических исследований в Российской Федерации, которые были разработаны в соответствии с Федеральным законом «О лекарственных средствах» № 86-ФЗ от 22.06.1998 г. (Собрание законодательства Российской Федерации от 29 июня 1998 г., №26 ст. 3006; от 13 января 2003 г., №2, ст. 167; от 10 января 2000., №2 ст. 126; от 7 января 2002 г. (часть 1 №1, ст.2) и Положением Министерства Здравоохранения Российской Федерации, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 29.04.2002 № 284 (Собрание законодательства Российской Федерации, 6 мая 2002 г., №18, ст. 1771). Болезненные манипуляции и выведение животных из эксперимента проводились с использованием наркоза (хлоралгидрат 400 мг/кг).

Животные были получены из филиала «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН г. Чехов Московская область и а также ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»» РАМН (Россия, Ленинградская область). Экспериментальные группы животных формировались после истечения 2-х недельного карантинного периода необходимого для одомашнивания клеток и достаточ-

ного для адаптации животных в новых условиях обитания, а так же позволяющего исключить влияние транспортного стресса на результаты исследования. Крысы содержались в отдельной комнате общим объемом 40 м³ с вытяжной вентиляцией в клетках типа Т/4, производство Чехия, по 5 животных в каждой. Животные содержались при естественном 12-часовом светотемновом режиме, температура воздуха в помещении вивария была постоянной и колебалась в промежутке 20-22 °С, обеспечивался свободный доступ к воде и полнорационному гранулированному корму, предназначенному для лабораторных животных ГОСТ Р 50258-92 (Изготовитель ЗАО «Волосовский комбикормовый завод»). Формирование экспериментальных групп проводилось с учетом возраста, пола и массы крыс.

Необходимым условием для изучения фармакологической активности лекарственных средств, обладающих противоишемической активностью, является типирование животных по степени чувствительности к ишемическому повреждению. В условиях наличия больших внутривидовых различий этот фактор при отсутствии предварительной стратификации животных может исказить результаты эксперимента [4]. Известно, что степень чувствительности животных к ишемическому повреждению коррелирует с их поведенческой активностью. В связи с этим нами для исследования были отобраны животные, со среднеактивным типом поведенческого реагирования в тесте «открытое поле».

В работе изучена церебропротективная активность солей гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК): натрия оксибутират, лития оксибутират и магния оксибутират. Дозы исследуемых соединений составляли на этапе скрининга 100 мг/кг, 150 мг/кг и 200 мг/кг. Дозы были выбраны исходя из литературных данных о наличии у солей ГОМК седативного действия в дозах превышающих 300 мг/кг [109, 110], а также из расчета эквивалента средней терапевтической дозы для натрия оксибутирата [13].

В качестве растворителя для приготовления рабочих растворов использовался стерильный 0,9% раствор хлорида натрия, растворы готовились *ex tempore*. В качестве препаратов позитивного контроля использовались кавинтон (5% раствор в ампулах, производства Gedeon Richter, Венгрия), магния сульфат (250 мг/мл в ампулах, производства Эском НПК ОАО, Россия), пирарцетам (200 мг/мл в ампулах, производства Хант-Холдинг, Россия), мексидол (5% в ампулах, производства Фармасофт, Россия), пикамилон 10% в ампулах, производства Верофарм ОАО, Россия). Введение препаратов позитивного контроля осуществлялось в следующих дозах: пирарцетам- 800 мг/кг [81], пикамилон - 100 мг/кг [10], кавинтон - 3,2 мг/кг [35], магния сульфат - 300 мг/кг [115], мексидол - 20 мг/кг [32].

Режим введения исследуемых соединений и препаратов позитивного контроля: при моделировании окклюзии общих сонных артерий и гравитационной ишемии - однократно профилактически за 30 минут до нанесения повреждения; при моделировании травматического повреждения - однократно сразу после моделирования, а при моделировании ОСМА на фоне недостаточности половых гормонов - ежедневное двухкратное лечебное введение в течение 7 дней.

При моделировании ишемии путем ОСА и гравитационной ишемии были сформированы группы численностью $n=10$ для групп исследуемых соединений, ложнооперированной группы и препаратов сравнения, и $n=20$ для ишемизированной контрольной группы животных. При моделировании фокальной ишемии, травматического повреждения глобального мозга и нормобарической и гемической гипоксии все группы были численностью $n=12$.

В работе использованы методические подходы в изучении церебропротекторных свойств исследуемых соединений, изложенные в «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [57].

2.1. Методы экспериментального моделирования ишемического и травматического повреждения головного мозга животных:

1. Метод моделирования острой преходящей ишемии, вызванной гравитационными перегрузками в краниокаудальном векторе.

Нарушение мозгового кровообращения ишемического генеза, моделируемое воздействием гравитационными продольными перегрузками в краниокаудальном векторе, рекомендуется использовать для направленного поиска и изучения церебропротективных средств [21]. Продольные гравитационные перегрузки, создаваемые вращением, вызывают падения артериального давления в магистральных артериях мозга до нулевого уровня, приводя тем самым к глубоким нарушениям кровоснабжения мозга у экспериментальных животных. Однако тяжесть возникающих церебральных нарушений зависит от величины, продолжительности и вектора радиальных ускорений. Так согласно литературным данным, артериальное давление в каротидном бассейне падает до нулевого уровня уже при пятиминутном центрифугировании в краниокаудальном векторе с ускорением 4g, что приводит к запуску ишемического каскада. [59]. Опираясь на ранее проведённые исследования сотрудников кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ [9; 4] было выбрано значение перегрузки равное 9g длительностью 5 минут, вызывающее неврологический дефицит высокой степени тяжести практически у всех животных.

Установка представляет собой металлический стол с размещенными на нем агрегатами и механизмами, позволяющими создавать и плавно регулировать гравитационные перегрузки от 0 до 30 G. Комплекс рассчитан на время постоянной работы до 1 часа, максимальный общий допустимый вес испытуемых животных до 20 кг. На концах штанги с обеих сторон установлены специальные контейнеры, в которые в строго краниокаудальном направлении относительно вектора ускорения помещались животные.

Исследуемые вещества вводились животным однократно за 30 минут до центрифугирования. Непосредственно перед центрифугированием животные

подвергались 24-часовой пищевой депривации при сохранении свободного доступа к воде.

2. *Метод моделирования ишемии головного мозга, вызываемой необратимой одномоментной билатеральной окклюзией общих сонных артерий у крыс.*
[7, 242]

В наших исследованиях необратимая одномоментная билатеральная окклюзия общих сонных артерий (ОСА) у крыс выполнялась следующим образом: под эфирным наркозом, после удаления шерстяного покрова животного с помощью депиляционного крема и проведения антисептической обработки операционного поля, по средней линии шеи проводили небольшой разрез мягких тканей, открывая доступ к сосудам. После чего тупым способом выделялись левая и правая общие сонные артерии, которые затем лигировались и перевязывались (у группы ложнооперированных животных обе сонные артерии также выделялись, но перевязка не выполнялась). Рана послойно ушивалась, операционное поле обрабатывалось раствором антисептика. После операции животных помещали в индивидуальные клетки под согревающую лампу до момента выхода из наркоза. В первые 3 часа постоперационного периода за крысами вели непрерывное визуальное наблюдение с целью фиксации случаев ранней гибели. Далее проводилась регистрация выживаемости животных на 3, 6, 12, 24, 48 и 72 час после операции. Перед операцией животные подвергались 24-часовой пищевой депривации при сохранении свободного доступа к воде. Исследуемые вещества вводились животным однократно за 30 минут до воспроизведения патологии.

3. *Метод моделирования травматического повреждения головного мозга у крыс.*

Моделирование травматического повреждения головного мозга осуществлялось путем нанесения укола иглами, равнорасположенными на панели площадью 5x5 мм по пять игл в ряду на расстоянии 1 мм друг от друга, обеспечивающими стандартное и дозированное повреждение мозговой ткани

[80, 49]. Так наркотизированным животным (хлоралгидрат 400 мг/кг) с использованием депиляционного крема удалялся шерстяной покров верхней поверхности черепа, которая в последствие скальпировалась. Трепанация производилась бором с конической фрезой, до твердой мозговой оболочки, которая сохранялась интактной. Далее при помощи панели с иглами наносили повреждение мозговой ткани, путем погружения на глубину 5 мм. Рана послойно ушивалась, операционное поле обрабатывалось раствором антисептика. После операции животных помещали в индивидуальные клетки под согревающую лампу до момента выхода из наркоза. В первые 3 часа постоперационного периода за крысами вели непрерывное визуальное наблюдение с целью фиксации случаев ранней гибели. Перед операцией животные подвергались 24-часовой пищевой депривации при сохранении свободного доступа к воде. Исследуемые вещества вводились животным однократно сразу после воспроизведения патологии.

4. Метод моделирования фокальной ишемии головного мозга, вызванной необратимой окклюзией средней мозговой артерии.

Экспериментальная ишемия головного мозга у животных воспроизводилась путём необратимой окклюзии средней мозговой артерий (ОСМА) крыс под хлоралгидратным наркозом. (400 мг/кг интраперитонеально) по методике, предложенной Tamura et al. (1981) [215] в модификации Топчян А.В., Мирзоян Р.С. и Баласанян М.Г. (1996) [68]. После удаления шерстяного покрова с помощью депиляционного крема и обработки операционного поля раствором антисептика производили вертикальный разрез (около 3 см) мягких тканей между левым глазом и основание левого уха с помощью тонких прямых ножниц. Рана расширялась, после чего обнажали слюнную железу, расположенную в задненижнем квадрате операционного поля. Обнажали скуловую кость с последующей её частичной резекцией. После чего проводили выделение височной мышцы, делали горизонтальный разрез с помощью ножниц и брали на крючки, с обнажением височной ямки, дно которой обра-

зует крыловидная мышца с проходящим рядом нижнечелюстным нервом. Раздвигали крыловидную мышцу и открывали поверхность черепа между овальным отверстием и отверстием зрительного нерва. В этой области, а именно, под нижним краем сустава между нижней и верхней челюстями высверливали трепанационное отверстие диаметром около 4-х мм и тем самым обнажали район расположения средней мозговой артерии. Предварительно надсекая и раздвигая твёрдую мозговую оболочку, обнажали левую среднюю мозговую артерию, под нее подводили стерильную нейлоновую лигатуру, и перевязывали ее. У ложнооперированных животных лигатура подводилась, но не затягивалась. Далее мы по возможности восстанавливали топографию мышц и мягких тканей операционного поля. Операционную рану послойно ушивали, животных помещали под согревающую лампу до момента выхода из наркоза. Данный метод характеризуется достаточно выраженным повреждающим действием на функционирование ЦНС (формируется выраженный неврологический и поведенческий дефицит, характеризующийся ассиметрическим поражением моторной функции у животных) и низкой летальностью, при этом является общепризнанным и широко используемым [68]. В послеоперационном периоде животным вводили цефазолин в дозе 10 мг/кг, а также переводом животных на щадящую пищу (размоченный комбикорм).

2.2. Метод моделирования дефицита половых гормонов.

Овариоэктомия является общепринятым методом для моделирования недостаточности половых гормонов у самок крыс [167]. Так после операции в течение 30 дней развивается комплекс нарушений, характерный для периода менопаузы.

Под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг интраперитонеально) производится разрез длиной 2 см. С помощью артериальных щипцов, жировая прослойка с яичниками аккуратно захватывается. Яичники отделяются от прослойки, которая затем помещается обратно в брюшную полость животного-

го. Далее рана послойно ушивается. В постоперационном периоде животным вводили цефазолин в дозе 10 мг/кг.

2.3. Метод оценки неврологического дефицита у животных.

Для оценки церебропротективного действия исследуемых соединений в условиях ишемии, вызванной окклюзией общих сонных артерий, среднемозговой артерии, нарастающими гравитационными перегрузками в краниокаудальном векторе, черепно-мозговой травмой были использованы балльная шкала оценки инсульта McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной [176; 23], 9-балльная шкала Combs и D'Alecy [119] и шкала Garcia [133].

Шкала оценки инсульта McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (1996) представлена в таблице 3. Фиксируемыми параметрами являлись количество крыс в группе с признаками неврологического дефицита легкой (0,5-2,5), средней (2,5-5,5) и тяжелой (5,5-10) степени неврологического дефицита. При наличии у животного нескольких признаков неврологического дефицита баллы суммировались и определялось среднее значение балла по группе.

Шкала оценки неврологического дефицита Combs и D'Alecy (1987) [119] представлена в таблице 4. Итоговый балл в ней формируется как сумма баллов в 3-х двигательных тестах, определяющих мышечную силу, цепкость-тягу и равновесие, что позволяет оценить функциональное состояние экстрапирамидной системы. При этом 0 баллов свидетельствует о максимальной выраженности нарушений, а 9 баллов – об их отсутствии. Для снижения вероятности получения неверного значения вследствие случайности или субъективности экспериментатора каждый двигательный тест проводился по два раза для одного животного. Также между тестами осуществлялись 2-3 минутные перерывы для нивелирования эффекта усталости животного.

Тест на мышечную силу. Использовался проволочный экран размером 15×30 см, который мог совершать отклонение от горизонтального положения от 0° до 90°. Размер проволочной ячейки составлял 0,6×0,6 см. Экран распо-

лагался в вертикальной позиции на высоте 70 см от матерчатой подложки толщиной 8 см для снижения риска травматизации животного при падении с экрана. Животное первично располагали на горизонтальном экране, затем его отклоняли в вертикальное положение и производили расчет времени до падения животного. Время тестирования составляло 15 секунд.

Тест на равновесие. Использовался деревянный стержень диаметром 2,5 см, который располагался на высоте 40 см от матерчатой ткани, обеспечивающее мягкое падение животного со стержня. Животное помещали на стержень и фиксировали время до падения животного. Время тестирования составляло 30 секунд.

Тест на цепкость-тягу. Часть теста, определяющая цепкость животного, дает возможность оценить способность животного удерживаться на горизонтальной веревке передними лапами, что отражает мышечную силу. Часть теста, определяющая силу мышечной тяги животного, дает возможность оценить способность животного подтягивать свешивающиеся задние конечности на веревку и отражает как мышечную силу, так и координацию. Нейлоновую веревку диаметром 0,5 см располагали горизонтально на высоте 70 см от матерчатой подложки, толщиной 8 см. Передние лапы животного помещали на веревку и отпускали задние конечности животного. Фиксировали время до падения животного, и способность животного подтянуть хотя бы одну заднюю конечность на веревку.

Шкала оценки неврологического дефицита Garcia (1995) [133] представляет собой балльную шкалу для оценки асимметрии движений и реакций животного. Итоговый балл в ней формируется как сумма баллов в 6-и тестах. При этом 0 баллов свидетельствует о максимальной выраженности нарушений, а 3 балла – об их отсутствии. Между тестами осуществлялись 2-3 минутные перерывы для нивелирования эффекта усталости животного.

Тест спонтанной активности. Исследование проводится в течение 5 минут в условиях естественного места нахождения (клетка). Активность жи-

вотного базируется на оценке способности подходить ко всем 4 стенкам клетки. Баллы обозначают следующее:

3 балла – животное свободно передвигается по клетке кругами и исследует как минимум 3 стенки;

2 балла – движение животного слегка затруднены, но тем не менее оно достигает стенок клетки, колеблется перед движением, также периодически занимает стойку у одного края клетки;

1 балл – тяжелое повреждение – животное не достигает края клетки и едва двигается в клетке;

0 баллов – животное не двигается совсем.

Симметрия при движении четырех лап. Животное удерживают в воздухе за хвост для оценки симметрии движения лап. Баллы обозначают следующее:

3 балла – животное вытягивает лапы симметрично;

2 балла – лапы на одной стороне вытягиваются более или менее медленно чем на другой;

1 балл – движения лап одной стороны минимальны;

0 балл – движений лап нет совсем.

Вытягивание передних лап. Животное помещают на край стола, держа при этом ее за хвост. Симметрию вытягивания передних лап оценивают, когда передние лапы находятся на столе, а задние в воздухе. Баллы означают следующее:

3 балла – передние конечности вытягиваются свободно, животное шагает симметрично;

2 балла – одна из лап вытянута не до конца, походка нарушена;

1 балл – одна лапа движется минимально;

0 баллов – одна лапа не движется совсем.

Залезание по сетке. Животное помещают на сетку и оценивают способность вскарабкиваться на нее. Также оценивают способность животного

удерживаться при попытке снять ее за хвост с сетки. Баллы обозначают следующее:

3 балла - животное легко забирается по сетке и крепко держится за прутья;

2 балла - повреждение на одной стороне не позволяют животному крепко взяться за прутья и легко карабкаться на сетку;

1 балл - животное не может вскарабкаться на прутья совсем, или совершает манежные движения вместо залезания на сетку;

Проприорецепция тела животного. Оценивают реакцию животных на прикосновение тупой палочкой к сторонам тела животного:

Таблица 3.

Шкала оценки неврологического дефицита по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (1996) [23]

| Симптомы | Баллы |
|---|--------------|
| Вялость | 0.5 |
| Тремор | 1 |
| односторонний полуптоз | 1 |
| двухсторонний полуптоз | 1.5 |
| неспособность отдергивать конечность при ее удержании | 1.5 |
| односторонний птоз | 1.5 |
| двухсторонний птоз | 1.5 |
| манежные движения | 2.0 |
| парез 1-4 конечности | 2-5 |
| паралич 1-4 конечности | 3-6 |
| кома | 7.0 |
| летальный исход | 10.0 |

Таблица 4

**Шкала оценки неврологического дефицита Combs and D'Alecy
(1987) [103]**

| Балл | Удержание себя на экране-сетке | Тест на равновесие на стержне | Удержание себя передними лапами на веревке |
|-------------|---------------------------------------|---|---|
| 0 | Падение 0-5 секунд | Отсутствие хвата или баланса на стержне | Вис 0-2 секунды |
| 1 | Падение 6-10 секунд | Нахождение на стержне менее 10 секунд | Вис 3-4 |
| 2 | Падение 11-14 секунд | Нахождение на стержне 11-20 секунд | Вис более 5 секунд, третья конечность не находится на веревке |
| 3 | Вис на экране больше 15 секунд | Нахождение на стержне 21-30 секунд | Вис более 5 секунд, третья конечность находится на веревке |

3 балла - животное реагирует на прикосновение поворотом головы, и одинаково реагирует на прикосновения к каждой из сторон тела;

2 балла - животное медленно реагирует на прикосновение к одной из сторон;

1 балл - животное совсем не реагирует на прикосновение к одной из сторон;

Реакция на прикосновение к вибриссам. Оценивается реакция животных на прикосновение той же палочкой к вибриссам, таким образом, чтобы палочка не попадала в зрительное поле животного:

3 балла - животное реагирует на прикосновение поворотом головы, и одинаково реагирует на прикосновения к каждой из сторон тела;

2 балла - животное медленно реагирует на прикосновение к одной из сторон;

1 балл - животное совсем не реагирует на прикосновение к одной из сторон.;

На модели гравитационной ишемии оценка неврологического дефицита проводилась по шкалам McGraw, Combs and D'Alecy через час после прекращения воздействия перегрузок, а на модели ОСА – на 3, 6, 12, 24, 48 и 72 час после операции. На модели травматического повреждения головного мозга оценка неврологического дефицита проводилась по шкалам Combs и D'Alecy и Garcia через 1, 4, 7 суток от момента нанесения повреждения. На модели ОСМА - оценка неврологического дефицита производилась по шкалам Combs и D'Alecy и Garcia через 1, 3, 7 суток от момента нанесения повреждения.

2.4. Методы изучения противогипоксической активности соединений.

1. Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией («баночная» гипоксия) [57] используется для оценки антигипоксического эффекта фармакологически активных веществ. Эксперимент выполнялся на мышах. Методика заключалась в помещении животных одинакового веса по одному в герметически закрытые контейнеры объемом 80 см³. Исследуемые соединения вводились до начала эксперимента с учетом пика их действия. Регистрировалось время до наступления апноэ (резервное время, время жизни в условиях гипоксии) и продолжительность жизни животного, которое фиксировалось визуально.

2. Гемическая гипоксия, вызванная нитритной интоксикацией [56], также использовалась для оценки противогипоксического действия соединений. Тест проводился на мышах. Эксперимент заключался в однократном подкожном введении животным в шейную область спины нитрита натрия в токсической дозе 250 мг/кг с последующей регистрацией времени выживания животных.

В обоих случаях увеличение продолжительности жизни животных в условиях гипоксии (по сравнению с контролем) под влиянием изучаемых соединений свидетельствовало о наличии у них антигипоксической активности.

2.5. Методы оценки поведенческого статуса, когнитивных и мнестических функций у животных.

Влияние исследуемых соединений на поведение, а также когнитивные и мнестические функции оценивали при проведении стандартных психофармакологических тестов. Таким образом, оценку поведенческого, когнитивного и мнестического статуса животных, на моделях окклюзии ОСА и гравитационной ишемии проводили в тестах: «Открытое поле-круг» (ОП), «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ), «Тест экстраполяционного избавления» (ТЭИ). Аналогичную оценку животных на модели травматического повреждения проводили на тестах, указанных выше, а также в тестах «тест лестница», «сужающаяся дорожка».

1. Тест «открытое поле» (ОП) [77, 14] предназначен для изучения поведения грызунов в новых условиях и позволяет оценить: выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов; уровень эмоционально-поведенческой реактивности животного, исследовательского/оборонительного поведения; симптомы неврологического дефицита. Тестируемое животное помещается в центральный круглой (в тесте «ОП-квадрат» на этапе типирования животных арена установки была квадратной, принцип и оцениваемые показатели оставались теми же) белой арены хвостом к экспериментатору. Визуальный контроль за поведением животного проводили в течение 3-х минут, фиксировались следующие показатели: число пересеченных секторов, количество стоек (учитывали и закрытые и открытые стойки), количество обследованных отверстий. Об ориентировочно-исследовательской активности судили при оценке суммы стоек и заглядываний в отверстия, а по количеству пересеченных секторов – о спонтанной двигательной активности.

2. *Методика оценки условного рефлекса пассивного избегания» (УРПИ)* является базисной моделью для выявления специфической ноотропной активности веществ [14]. Она используется для оценки влияния веществ на формирование, сохранение и воспроизведение памятного следа в норме и в условиях его нарушения. Данная методика выполнялась следующим образом:

1) формирование рефлекса пассивного избегания – крысу помещали в освещенный отсек (лампа мощность 100 Вт) в центральную зону, хвостом к отверстию в темный отсек, обследовав светлый отсек крыса переходила в темный, через электрический пол которого подавался ток 40 В, 3 импульса по 1 с, с интервалом 0,5 с, тем самым животные получали электроболовое раздражение. За животным наблюдали в течение 3-х минут, если оно вновь заходило в темный отсек электроболовое раздражение наносили повторно, крысы которые не заходили – из эксперимента исключались. Фиксировались следующие показатели: латентный период первого захода в темный отсек (время от момента помещения животного в середину площадки до первого захода в темный отсек) и количество заходов в него

2) контроль выработки рефлекса – все животные повторно не должны заходить в темный отсек установки, зашедшие животные исключались из эксперимента

3) воспроизведение навыка пассивного избегания – на данном этапе в отличие от этапа обучения, если животное заходило в темный отсек, то электроболовое раздражение не наносили. Регистрировались аналогичные показатели, что и при обучении плюс общее время, проведенное в темном отсеке. При проверке выработки рефлекса на втором этапе тестирования латентный период первого захода в темный отсек и количество заходов в него сравниваются с аналогичными показателями при обучении.

3. *«Тест экстраполяционного избавления»* [8] предназначен для изучения когнитивных функций грызунов в условиях аверсивной среды и позволя-

ет оценить: индивидуальные различия когнитивного стиля решения задачи (поиска пути активного избавления из авersiveивной среды). Фиксируются следующие показатели: латентный период (ЛП) двигательной активности (время от момента погружения в воду до начала активного плавания), авersiveивные реакции – прыжки внутри цилиндра (активные попытки выпрыгнуть из воды), ЛП подныривания (время от момента погружения животного в воду до подныривания под края цилиндра). Также как и тест УРПИ методика включает в себя этап обучения навыка (выработка рефлекса избавления) и этапа его воспроизведение через 24 часа. Животные, не решающие задачу за время наблюдения на этапе обучения исключаются из опыта.

Обучение и воспроизведение навыков животных в тестах ОП, УРПИ и ТЭИ проводилось перед моделированием и через 72 часа после нанесения повреждения соответственно.

4. Тест «сужающаяся дорожка» [207]

Установка для теста «сужающаяся дорожка» представляет собой приподнятую горизонтальную планку (дорожку) длиной 165 см, с темной камерой, закрепленной с одного конца. По обоим концам дорожки находятся «стартовая» (15x6 см) и «разгрузочная» (15x1,5 см) площадки. Между ними находится равномерно сужающаяся, от 6 см в начале и 1,5 см в конце, часть дорожки длиной 135 см. На протяжении всей дорожки, по обеим ее сторонам и на 2 см ниже уровня ее плоскости находятся выступы по 2 см в ширину, которые позволяют животным ставить ослабшую переднюю или заднюю конечность, чтобы не упасть с дорожки. Процедура тестирования записывалась на видеокамеру с высоким разрешением, установленную сбоку и перпендикулярно дорожке таким образом, чтобы в кадр попадала полностью вся установка. Для того чтобы так же в кадре присутствовала вся дорожка с другой стороны, по другую сторону установки фиксировалось и настраивалось длинное узкое зеркало.

В начале тестирования животное всегда помещают в темный отсек на 1 мин. Впервые два дня крысу постепенно приучают бегать по установке. Обучение начинают с того, что животное сажают вблизи (10-15 см) от черного ящика. Далее это расстояние постепенно увеличивают до $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ длины доски при ежедневном обучении. В день воспроизведения животное запускают с самого начала доски (с широкой части).

При моделировании одностороннего повреждения головного мозга, животное так же пытается приспособиться к жизни с ослабленной или неработающей конечностью, как было бы в случае ее ампутации. При проведении тестирования, это маскировало бы возможный процесс восстановления функции или меньшую потерю функции конечности под влиянием профилактического или лечебного введения исследуемого вещества. Конструктивные особенности теста «сужающаяся дорожка» не позволяют компенсаторным моторным навыкам замаскировать выпадение функции пораженной конечности, как было бы в случае простой горизонтальной планки: животное балансировало бы на установке, распределяло вес между здоровыми лапами, возникали бы критические ошибки (падение с установки), в результате было бы сложно определить, насколько нарушена функция конечности. Напротив, выступы, имеющиеся на дорожке, обеспечивают, при необходимости, опору для переноса веса при шаге с той самой стороны дорожки, с которой имеется дефицит, предотвращая падение животного, однако совершенную ошибку возможно зарегистрировать. Сужение дорожки, обеспечивает возрастание сложности выполняемой задачи. В качестве стимула заставляющего тестируемое животное векторно перемещаться по дорожке служит яркий свет на одном конце и темное пространство на другом.

Для оценки моторного дефицита использовали специальную систему расчёта [207]. Длину доски условно делят на 3 части: широкую, среднюю и узкую. Подсчитывают общее число шагов, которое совершило животное, количество ошибок, совершенное как контралатеральной, так и ипсилатераль-

ной стороне повреждения конечности на каждом из участков конической дорожки. Процент ассиметрии вычисляют для каждого участка дорожки по формуле:

$$A = \frac{(n_k - n_y) \times 3}{N} \times 100$$

где, n_k - количество ошибок, совершенных животным контрлатеральной стороне повреждения конечностью, n_y - количество ошибок, совершенных животным унилатеральной стороне повреждения конечностью, N - общее число шагов животного на дорожке.

Данный параметр получают для каждого животного и используют для оценки тяжести поражения.

5 «Тест лестница» («Staircase test»)[182].

Установка для проведения теста «лестница» представляет собой удлиненную камеру из органического стекла (285×90×60 мм) с закрывающимся входом с одной стороны. Внутри находится центральная приподнятая плоская платформа длиной 2/3 камеры и шириной 27 мм, образующая небольшое свободное пространство в самом начале камеры и узкое пространство над платформой. В дальнем конце по обеим сторонам от платформы находится съемная парная лестница, имеющая 7 уходящих вниз ступеней. Животное занимает положение на платформе и получает возможность дотянуться и собрать подсолнечные зерна, помещенные в выемках ступеней парной лестницы по обеим сторонам от платформы. При этом если до двух верхних ступеней крыса может достать зубами и языком, то далее ей придется тянуться и собирать зерна одной лапой с каждой стороны, поскольку узость пространства не позволяет ему развернуться и использовать две передних конечности совместно. Животному приходится цепко схватывать зерно кистью одной лапы, чтобы подтянуть ее к себе. Задачей для крысы является собрать максимальное количество зерен корма, разложенных по два на каждой из семи

ступеней парной лестницы. Верхняя ступенька лестницы на 13 мм, а нижняя на 64 мм ниже центральной платформы. Таким образом, ступени представляют собой 7 уровней сложности этой задачи. Регистрируемым количественным показателем является либо общее число зерен собранных крысой и собранных каждой конечностью.

Среди методов для изучения мелкой моторики конечностей, данный тест имеет ряд преимуществ. Прежде всего, это отсутствие необходимости непосредственного наблюдения за животным в ходе эксперимента (или анализа видеозаписи), с субъективным подсчетом и описанием каких либо элементарных актов проделанных животным, например в ходе добывания и поглощения пищи, поскольку возможная индивидуальная вариабельность может усложнить интерпретацию значительного количества данных. В данном тесте, напротив, экспериментатор учитывает только сумму собранных животным зерен, не вдаваясь в подробности, какие мелкие манипуляции оно совершает, поскольку целью всех манипуляций для крысы, является поглощение максимума пищевых зерен в радиусе достижения передних лап.

Обучение животных. За три дня до начала тестирования мы начинали приучать животных к установке и к выполнению задачи. Для скорейшего ознакомления животного с установкой, кроме положенных по протоколу двух зерен на каждую ступеньку, дополнительные зерна размещались вдоль платформы и на верхних ступенях, итого по 3 зерна на каждой ступени, всего 42 гранулы по 21 шт с каждой стороны. Продолжительность ознакомления 15-30 минут в день, если животные не поддаются обучению, проводится по две процедуры в день. К четвертому дню крысы должны научиться успешно, выполнять задачу и доставать с каждой стороны платформы минимум по 4 зерна, в противном случае животное исключается из эксперимента (Montoya и др., 1991).

Процедура тестирования. После успешного ознакомления животного с установкой начинается трехдневный этап тестирования. Животные помеща-

ются в установку один раз в сутки на 10 или 15 минут, после чего животное удаляется из установки, подсчитывается число оставшихся зерен и вычисляется количество собранных. Длительность процедуры зависит только от одного фактора – животное не должно быть ограничено по времени. При тестировании зерна помещаются только на лестницу и только по две на ступень, животное находится в установке фиксированное время и окончательным результатом по каждому животному является количество собранных зерна за все три дня. Полученные результаты являются исходными данными до экспериментального моделирования повреждения головного мозга, после которого проводится одна или более серий тестирования для оценки восстановления моторных навыков передних конечностей. Если количество собранных на одной стороне зерна, устойчиво превышает число собранных на другой, возможно выделение преимущественно используемой животным конечности для нанесения повреждения на контралатеральной стороне.

Воспроизведение теста «сужающаяся дорожка» проводилось через 1, 4 и 7 суток после нанесения повреждения, а тест «лестница» проводился через 7 суток однократно после моделирования.

2.6. Методические подходы и способы регистрации уровня локального мозгового кровотока

Регистрации уровня локального мозгового кровотока методом ультразвуковой доплеровской флоуметрии.

Во всех экспериментальных сериях оценку уровня (усл.ед.) мозгового кровотока (МК) животных проводили с помощью ультразвуковой флоуметрии на доплерографе «Минимакс-Допплер-К» (ООО «СП-Минимакс», г. Санкт-Петербург), с использованием датчика с рабочей частотой в 25 Гц. Датчик доплерографа фиксировался в стереотаксической установке, мозговой кровотоки животных регистрировался в проекции средней мозговой артерии. Доступ к артерии создавался следующим образом: наркотизированным животным (хлоралгидрат 400 мг/кг) с использованием депиляционного крема

удалялся шерстяной покров верхней поверхности черепа, которая в последствие скальпировалась. Далее с учетом стереотаксических координат, началом которых принималась точка bregma, определялось место трепанационного отверстия. Трепанация производилась бором с конической фрезой, до твердой мозговой оболочки, которая сохранялась интактной. В качестве контактной среды использовался гель для проведения УЗИ.

2.7. Методы изучения биохимических показателей.

Метод определения потребления глюкозы.

Потребление глюкозы головным мозгом определялось разницей концентраций глюкозы в артериальной и венозной крови. Артериальная кровь забиралась путем пунктирования общей сонной артерии животного. Венозная кровь бралась из венозного сагиттального синуса животного. Определение содержания глюкозы проводили по глюкозооксидазному методу [31], согласно инструкции фирмы-производителя набора «Глюкоза-ФКД» (ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия).

Метод определения концентрации ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в плазме крови.

Концентрацию ТБК-АП определяли по образованию окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) с тиобарбитуровой кислотой, с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия). К 3 мл 1% ортофосфорной кислоты добавляли 0,25 мл плазмы крови, затем приливали 1 мл 0,7 % раствора тиобарбитуровой кислоты и помещали в кипящую водяную баню на 60 минут. Пробы охлаждали, добавляли 4 мл бутанола и встряхивали в течение 1 мин до образования однородной белой суспензии. После центрифугирования супернатант фотометрировали при двух длинах волн $\lambda=535$ нм и $\lambda=570$ нм против холостой пробы в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет содержания ТБК-АП проводили по формуле:

$$C = \frac{D_{535} - D_{570}}{0,156} \times 16$$

где С – концентрация ТБК-активных продуктов в опытной пробе; D_{535} - оптическая плотность пробы при 535 нм; D_{570} - оптическая плотность при 570 нм; 0,156 - коэффициент молярной экстинкции комплекса малоновый диальдегид-ТБК в л/мкмоль/см; 16 - коэффициент разведения плазмы.

Метод определения активности супероксиддисмутазы в плазме крови.

Определение активности супероксиддисмутазы проводили по методу В.А. Костюк [38], который основан на реакции окисления кверцетина. К 4,4 мл 0,015 М фосфатного буфера рН 7,8, содержащего 0,08 мМ этилендиаминтетраацетата и 0,8 мМ тетраметилэтилендиамина, вносили 0,5 мл плазмы крови, в холостую и контрольную пробы вносили 0,5 мл 0,9% NaCl. Реакцию запускали внесением 0,1 мл раствора кверцетина в диметилсульфоксиде (1 мг на 5 мл), в холостую пробу вносили 0,1 мл диметилсульфоксида.

Измеряли оптическую плотность проб на 0 и 20 минуте при длине волны $\lambda=406$ нм против холостой пробы в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет процента ингибирования проводили по формуле:

$$I = 100 - \frac{D_{оп\ 0} - D_{оп\ 20}}{D_{кон\ 0} - D_{кон\ 20}} \times 100$$

где I – процент ингибирования; $D_{оп}$ и $D_{кон}$ – оптические плотности опытной и контрольной проб.

Метод определения активности каталазы в плазме крови.

Определение активности каталазы проводили по методу М.А. Королюк [37], основанном на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена окрашенный в желтый цвет стойкий комплекс. К 1 мл 0,03% перекиси водорода добавляли 0,1 мл плазмы крови, в холостую пробу вносили 0,1 мл дистиллированной воды. Пробы инкубировали в термостате 10 минут при

37⁰С. Реакцию останавливали 1 мл 4% раствора молибдата аммония во все пробы.

После центрифугирования, фотометрировали при длине волны $\lambda=410$ нм против дистиллированной воды в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет активности каталазы проводили по формуле

$$A = (D_{\text{хол}} - D_{\text{оп}}) \times 0,1 \times 600 \times 22,2$$

где А - активность каталазы (мкат/л); $D_{\text{хол}}$ и $D_{\text{оп}}$ – экстинция холостой и опытной проб; 0,1 - объем вносимой пробы; 600 - время инкубации; 22,2 - коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода.

Метод изучения кислотной резистентности эритроцитов.

Забор крови производился из венозного сагиттального синуса животного. Для проведения исследования 20 мкл крови смешивали с 20 мл физиологического раствора, получая, таким образом, взвесь эритроцитов в разведении 1:1000. Все исследования проводились при комнатной температуре. Измерения оптической плотности взвеси эритроцитов производили на спектрофотометр ПЭ-5400в (ЭКРОС, Россия) при длине волны $\lambda=600$ нм. В кювету рабочей ширины 10 мм вливали 2 мл взвеси эритроцитов из отдельной пробы и добавляли к ней в качестве гемолитика 2 мл 0,004 н НСl. После этого кювету помещали в кюветодержатель прибора. С момента введения во взвесь эритроцитов гемолитика величина светопропускания исследуемого раствора начинала изменяться в связи с разрушением клеток крови. Каждые 30 секунд отмечали показания прибора по шкале экстинции (E_0). Измерение вели до получения двух совпадающих показаний, т.е. до завершения гемолиза (E_n) [78].

2.8. Методы изучения основных параметров гемостаза крови.

Изучение агрегации тромбоцитов.

Влияние вещества на агрегацию тромбоцитов изучали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов научно-производственной фирмы «БИОЛА» (г. Москва) по методу Vorn G. в модификации Габбасова З.А. [18]. Метод основан на регистрации степени изменений светопропуска-

ния плазмы, богатой тромбоцитами, при добавлении к последней веществ, индуцирующих агрегацию, в условиях постоянного перемешивания, а также на анализе флюктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале.

Исследования проводили на богатой тромбоцитами плазме. Для этого цитратную кровь центрифугировали по 200g в течении 10 минут на центрифуге СН 6М. Бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием обогащенной тромбоцитами плазмы при 650g в течение 15 минут. Необходимо отметить, что исходный уровень тромбоцитов определяли в камере Горяева, при этом, статистически значимой разницы между их количеством в экспериментальных группах обнаружено не было.

В ходе эксперимента в кювету агрегометра вносили 0,3 мл плазмы, инкубировали при температуре 37° в течение 3мин. После инкубации добавляли индуктор агрегации динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) («Ренам», Россия) в конечной концентрации 5мкМ. При графической регистрации процесса агрегации тромбоцитов (в течении 5 минут) получали кривые, отражающие процесс падения оптической плотности обогащенной тромбоцитами плазмы. Уровень агрегации и скорость агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды и наклону агрегатограммы.

Методы изучения влияния исследуемых веществ на коагуляционный гемостаз.

Определение *показателей гемостаза* осуществлялось на программируемом оптико-механическом коагулометре - Минилаб 701 с использованием наборов для определения протромбинового времени, тромбин-теста, фибриноген - теста, активированного частичного тромбопластинового времени (производство НПО РЕНАМ, Россия). Исследование системы функционального состояния гемостаза также проводилось с помощью нового инструментального метода с использованием анализатора реологических свойств крови АРП-01 «МЕДНОРД», процесса свертывания крови и ее фибринолитической

активности. В основе методики – регистрация самых незначительных изменений агрегатного состояния крови, которые отражают внутренние процессы, протекающие в крови при ее свертывании и лизисе сгустка. В течение всего исследования строится кривая, отражающая процесс, рассчитываются амплитудные и хронометрические константы, характеризующие основные этапы гемокоагуляции и фибринолиза [72]:

- *период ретракции* (r) характеризует первую и вторую фазы свертывания крови, поскольку первая занимает почти 99% периода реакции, то повышение этого показателя происходит в результате ускорения образования кровяной протромбиназы и служит диагностическим свидетельством хронометрической гиперкоагуляции.

- *константа тромбина* (k) – показатель, характеризующий интенсивность тромбообразования и процесс полимеризации фибрина, изменяющий реологическое состояние крови. Характеризует время образования сгустка, зависит от концентрации образующегося тромбина и количества фибриногена, позволяет сделать выводы относительно интенсивности ферментативных процессов образования протромбиназы и тромбина, функциональной полноценности ключевых факторов протромбинового комплекса и антитромбиновом потенциале крови. Уменьшение данного показателя является признаком гиперкоагуляции, а резкое его удлинение - признаком гипокоагуляции.

- *показатель тромбиновой активности* (kk) – характеризует интенсивность тромбообразования, скорость и динамику формирования кровяных сгустков и фибринополимеризации. Уменьшение тромбиновой активности является признаком гипокоагуляции, увеличение – признаком гиперкоагуляции.

- *константа свёртываемости крови* (t), уменьшение показателя является признаком гиперкоагуляции, а резкое удлинение – признаком гипокоагуляции.

- *фибрин тромبوцитарная константа крови* (АМ, максимальная плотность сгустка) показатель характеризующий структурные реологические свойства образовавшегося сгустка (вязкость, плотность, пластичность), отражает функциональную полноценность его составных частей.

- *время формирования фибрин-тромبوцитарной структуры сгустка* (Т). Показатель времени формирования определяется как время, прошедшее от поступления первой порции крови в кювету прибора до формирования сгустка. За этот период завершается формирование полноценного сгустка, начинаются процессы ретракции и спонтанного лизиса. Показатель показывает функциональное состояние не только прокоагулянтного звена гемостаза но и антикоагулянтную активность.

- *суммарный показатель ретракции и спонтанного лизиса сгустка* (F), характеризующий полноценность ретракции и интенсивность фибринолиза. Процесс ретракции сгустка является одним из важнейших физиологических механизмов гемостаза. Он обеспечивает формирование структурно полноценного сгустка и способствует проникновению компонентов фибринолитической системы в его глубину. Ретракция и лизис сгустка происходят почти параллельно, что не противоречит теоретической модели свертывания крови.

2.9. Метод определения постишемического отека головного мозга.

Выраженность постишемического отека головного мозга оценивали по степени гидратации тканей головного мозга. Для этого после декапитации животного, головной мозг извлекали из черепной коробки, взвешивали и оставляли в термостате при 100°C на 24 часа, затем определяли процент потери влаги по формуле (влажная масса/сухая масса)-100% [143].

Статистическая обработка результатов исследования в зависимости от характера данных проводилась с использованием параметрических и непараметрических критериев. Статистически значимыми признавались различия при $p < 0,05$. В качестве переменных для оценки выживаемости в различных

группах выбраны «шансы» [43, 79], при этом все сравнения проведены с группой «Контроль-ишемия»:

Шанс выживаемости (Ш) =(Число выживших в группе)/(Число погибших в группе)

Для сравнения всех исследуемых групп с группой «Контроль-ишемия» в качестве показателя выбран относительный шанс (ОШ) [43]:

ОШ = (Шанс выживших в исследуемой группе)/(Шанс выживших в группе "Контроль-ишемия")

Относительный шанс (ОШ) показывает, во сколько раз шанс выживания в исследуемой группе больше (или меньше) шанса выживания в группе «Контроль-ишемия». Показатель выживаемости животных отражался как ОШ \pm 95% доверительный интервал.

Показатели бальной оценки неврологического дефицита животных были отражены как «медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль)». Все остальные количественные показатели каждой группы животных были отражены в таблицах и тексте как выборочное среднее значение \pm ошибка выборочной средней.

Сравнение номинальных данных (баллов) между группами проведено с использованием критерия «Хи-квадрат» [43, 79], который позволяет оценить совпадение (или различие) частот, с которыми встречаются те или иные показатели баллов в каждой группе. Проверка данных на нормальность осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка [54]. Если данные подчинялись нормальному распределению, анализ данных проводился с помощью критерия Ньюмена-Кейлса [25; 54]. Сравнение количественных данных проводилось с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и непараметрического критерия Колмогорова-Смирнова. Множественные сравнения количественных данных проводились с помощью критерия Крускала-Уоллиса и критерия Данна [25]. Обработка данных производилась с помощью пакетов программ Microsoft Excel и BioStat 2008.

Глава 3. Церебропротекторный эффект однократного профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты при необратимой окклюзии общих сонных артерий у крыс.

Церебропротекторный эффект оценивали на модели двусторонней перевязки сонных артерий у крыс. О наличии церебропротективного действия солей натрия, магния и лития оксибутиратов, а также препаратов сравнения судили по нескольким параметрам: 1) достоверному снижению летальности животных на фоне ишемии мозга по отношению к контрольной группе животных; 2) уменьшению выраженности неврологического и поведенческого дефицита животных по отношению к контрольной группе животных.

3.1. Влияние однократного профилактического введения различных доз исследуемых соединений на выживаемость животных, подвергшихся ишемии головного мозга, вызванной необратимой билатеральной окклюзией общих сонных артерий.

Моделирование билатеральной окклюзии общих сонных артерий приводило к гибели животных во всех группах. Результаты расчета шансов и показателей описательной статистики для исследуемых групп представлены в таб. 5.

Профилактическое введение магниевой, натриевой и литиевой солей гамма-оксимасляной кислоты во всех дозах снижало количество летальных исходов животных при ишемии головного мозга, при этом выраженность этого эффекта в разных дозах была не одинакова. Наибольший шанс выжить по сравнению с группой контрольных животных через 72 часа после моделирования ишемии были у животных, получавших: магния и лития оксибутираты в дозе 150 и 200 мг/кг, а также кавинтон в дозе 3,2 мг/кг. Относительный шанс для этих групп равен $9,3 \pm 1,3$, это означает, что шанс выживания в указанных группах статистически значимо в 9 раз выше, чем у контрольных животных.

Таблица 5

Летальность животных в условиях окклюзии сонных артерий на фоне однократного профилактического введения исследуемых соединений:

| Показатель | Контроль | Mg ГОМК | | | Na ГОМК | | | Li ГОМК | | | Пирацетам 800 мг/кг | Пикамилон 100 мг/кг | MgSO ₄ 300 мг/кг | Кавинтон 3,2 мг/кг |
|------------------|----------|--------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| | | 100 мг/кг | 150 мг/кг | 200 мг/кг | 100 мг/кг | 150 мг/кг | 200 мг/кг | 100 мг/кг | 150 мг/кг | 200 мг/кг | | | | |
| Число выживших | 6 | 5 | 8 | 4 | 4 | 7 | 5 | 5 | 5 | 8 | 5 | 4 | 6 | 8 |
| Число погибших | 14 | 5 | 2 | 6 | 6 | 3 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 6 | 4 | 2 |
| Шанс выживания | 0,43 | 1,00 | 4,00 | 0,67 | 0,67 | 2,33 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 4,00 | 1,00 | 0,67 | 1,50 | 4,00 |
| Отношение шансов | 1 | 2,3 | 9,3 | 1,6 | 1,6 | 5,4 | 2,3 | 2,3 | 2,3 | 9,3 | 2,3 | 1,6 | 3,5 | 9,3 |
| ОШ (±95%ДИ) | | 2,3±1,1 | 9,3±1,3* | 1,6±1,1 | 1,6±1,1 | 5,4±1,2 | 2,3±1,1 | 2,3±1,1 | 2,3±1,1 | 9,3±1,3* | 2,3±1,1 | 1,6±1,1 | 3,5±1,2 | 9,3±1,3* |

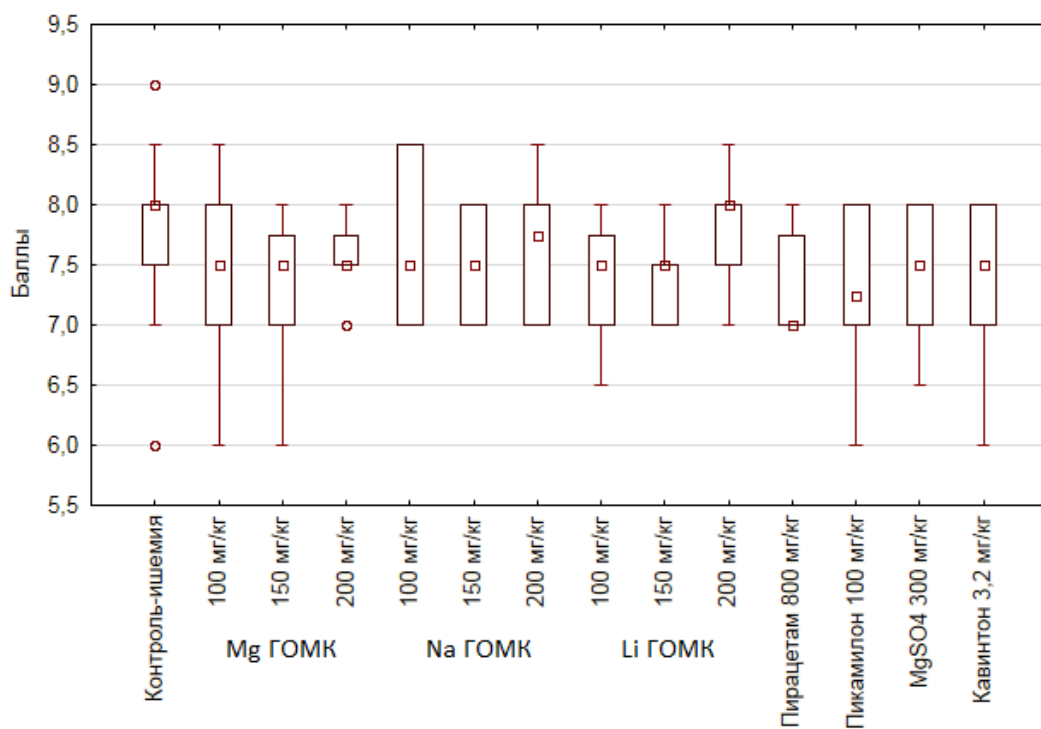
Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, MgSO₄ - магния сульфат, $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (критерий «Chi-квадрат»)

3.2. Влияние однократного профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность неврологического дефицита животных, подвергшихся необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Комплексная оценка неврологического дефицита у животных с воспроизведенной билатеральной окклюзией общих сонных артерий является информативной основой для выявления церебропротекторных свойств различных веществ. Так как неврологический дефицит животных в каждой группе оценивался по баллам шкал McGraw и Combs, то такие показатели являются «номинальными» значениями [43, 79] и они представлены в виде медиан и квартилей (25%-ый и 75%-ый квартили, размах значений).

У животных, подвергшихся ишемическому повреждению головного мозга, развивались стойкие явления неврологического дефицита. Так, при оценке состояния по шкалам Mc Grow и Combs у животных в первые часы от момента моделирования патологии наблюдались вялость, замедленность движений, наличие птозов века, параличей и парезов конечностей, тремора, манежных движений животных, появление судорог и наступление коматозного состояния, а также нарастание нарушений моторики и координации на стержне. Так, с 3 по 6 час наблюдения неврологический дефицит во всех группах животных был примерно одинаков и находился в интервале (7,0 – 8,0) баллов (Рис. 3А). С целью выбора данных для дальнейшего анализа было учтено, что показатели выживаемости (ОШ) для некоторых групп животных были низкими (Таб. 5). На основании этого было признано целесообразным оценить показатели неврологического дефицита животных через 72 часа после моделирования, получавших физиологический раствор, магния и лития оксибутираты в дозах 150 и 200 мг/кг, а также кавинтон. Через 72ч после моделирования в группе контрольных животных отмечались высокие баллы неврологического дефицита, так как значения большинства животных

А



Б

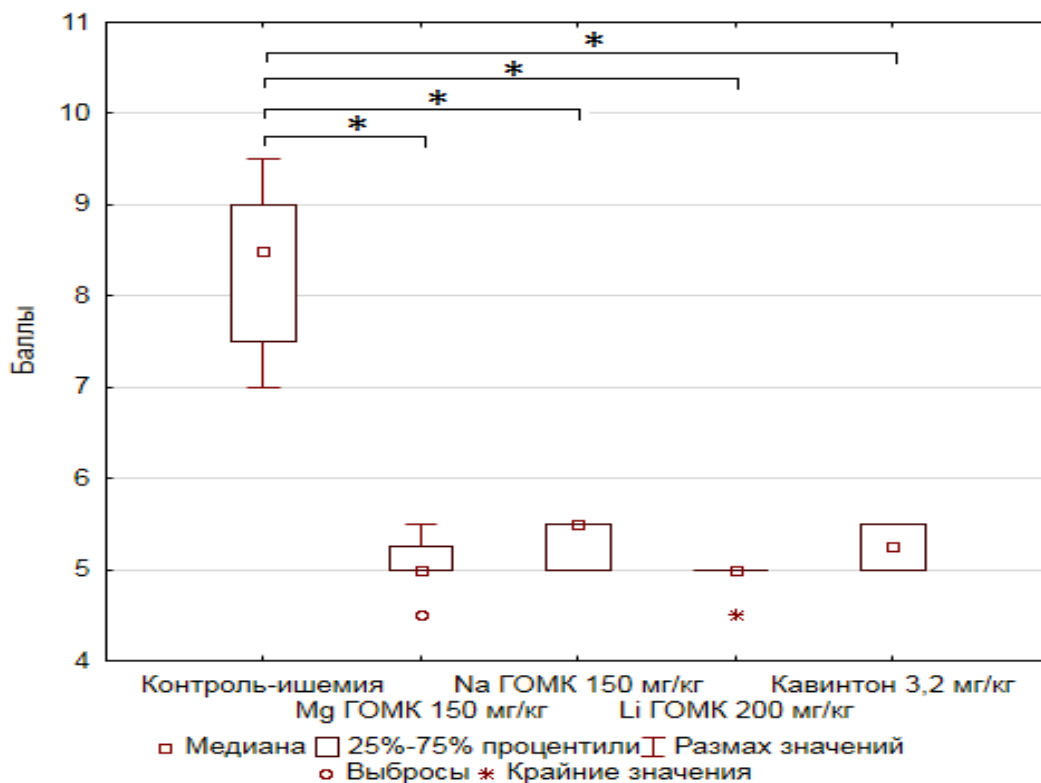


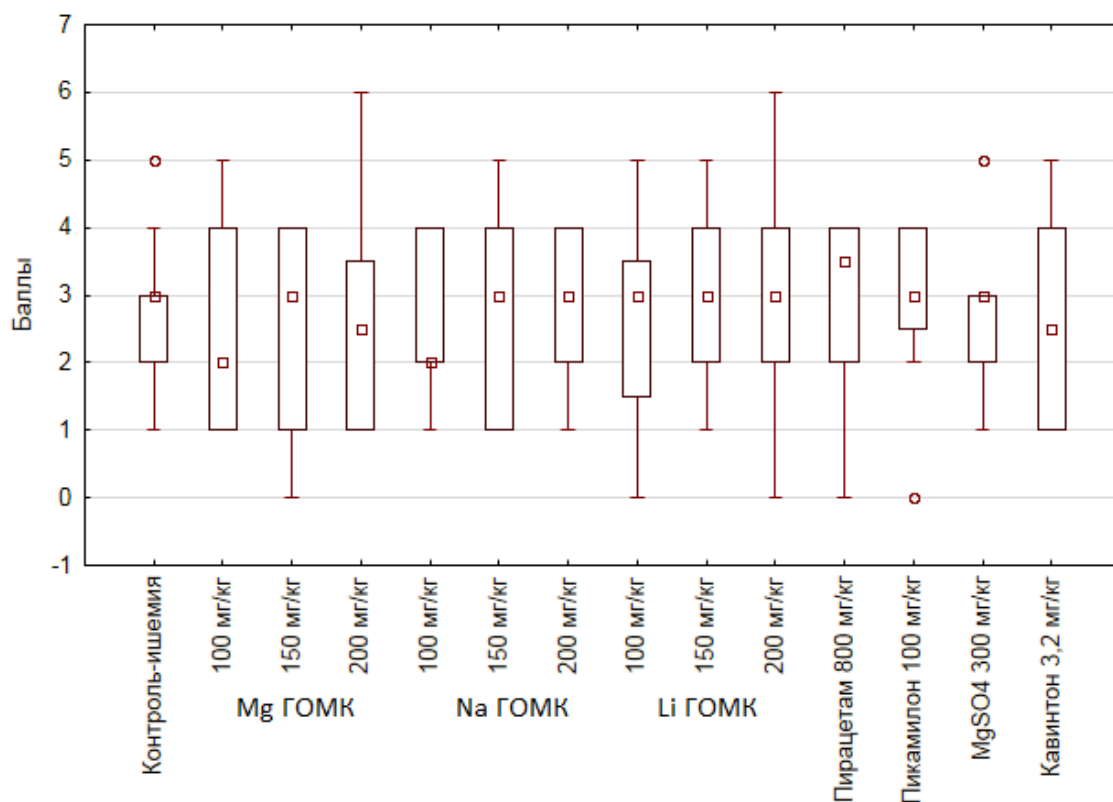
Рис.3 Выраженность неврологического дефицита (баллы по шкале McGraw) у животных через 6 часов (А) и 72 часа (Б) после ишемии на фоне однократного профилактического введения исследуемых соединений. Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират

находились в диапазоне от 7,5 до 9 баллов, что связано с возникновением у животных паралича конечностей и коматозного состояния (Рис. 3Б).

Введение соединений магния, натрия и лития оксибутиратов, а также препарата кавинтон приводило к заметному снижению неврологического дефицита у животных через 72 часа от момента моделирования патологии (Рис. 3Б). Например, в группе животных, получавших магния оксибутират в дозе 150 мг/кг, у большинства животных балл неврологического дефицита составлял от 5,0 до 5,25. Через 72 часа после моделирования показатели неврологического дефицита в 3-х группах исследуемых соединений близки и имеют малые различия. Сравнение показателей баллов неврологического дефицита в группах животных, получавших магния оксибутират в дозе 150 мг/кг и кавинтон в дозе 3,2 мг/кг показало, что эти различия статистически незначимы ($\chi^2 = 6,58$ на уровне значимости $p = 0,08$, критическое значение $\chi^2 = 5,99$).

При оценке неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy было также отмечено, что с 3 по 6 час наблюдения неврологический дефицит во всех группах животных был примерно одинаков и находился в интервале (1,0 – 4,0) баллов (Рис. 4А). Для наглядности на рис. 4Б отображены показатели животных из групп исследуемых соединений, а также всех препаратов сравнения. Через 72 часа после моделирования максимального значения (медиана равная 7 баллам) достигают показатели в двух группах животных, которые получали магния и лития оксибутираты в дозах 150 мг/кг и 200 мг/кг, которые практически идентичны. Меньшее значение (медианы равные 6 и 5 баллов) имеют показатели группы животных, получавших кавинтон в дозе 3,2 мг/кг и натрия оксибутират в дозе 150 мг/кг. Наименьшее значение (медиана равная 2 баллам) имеют показатели группы контрольной группы. Для выявления различий через 72ч после моделирования между группами животных, получавших магния оксибутират и кавинтон были выполнены расчеты критерия χ^2 , которые показали, что эти различия статистически незначимы $\chi^2 = 4,33$ на уровне значимости $p = 0,22$, а критическое значение $\chi^2 = 7,88$).

А



Б

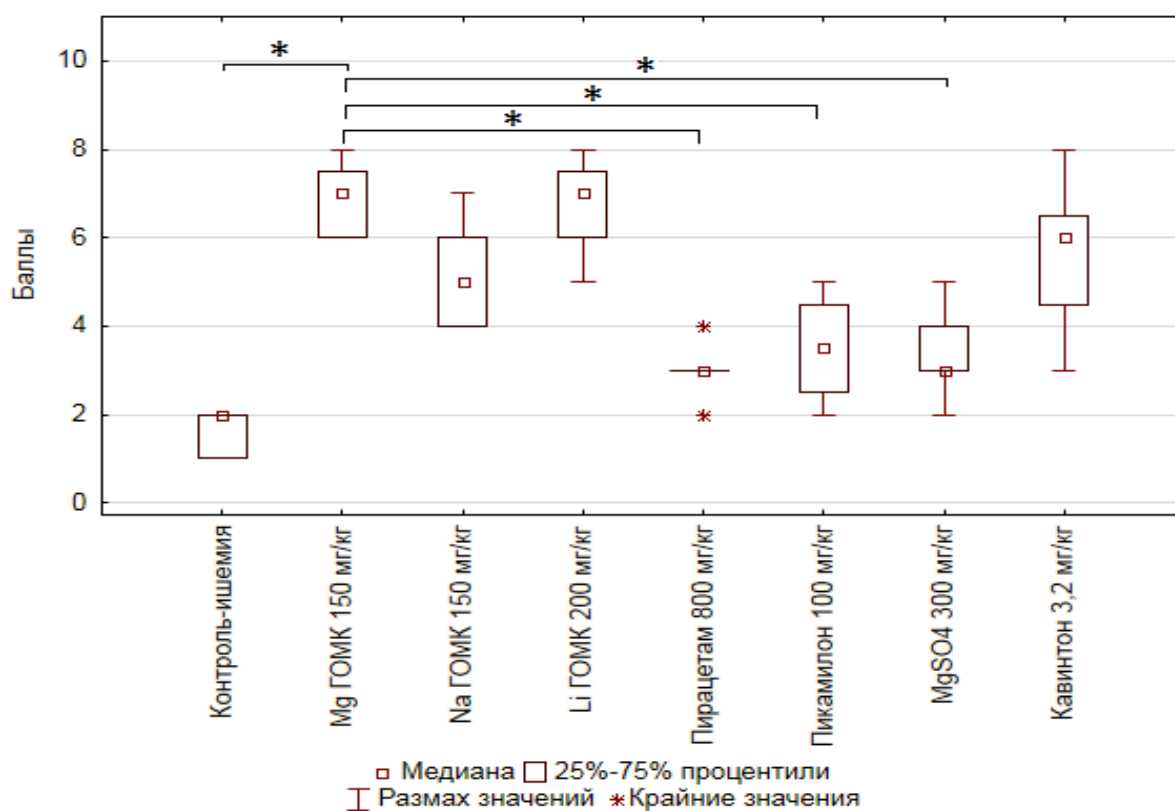


Рис.4 Выраженность неврологического дефицита (баллы по шкале Combs и D'Alencu) у животных через 6 часов (А) и 72 часа (Б) после ишемии на фоне однократного профилактического введения исследуемых соединений. Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират

Таким образом, можно отметить, что статистически значимое снижение неврологического дефицита по шкале McGraw оказали соединения магния, натрия, лития оксибутираты и препарат сравнения кавинтон. Однако при более детальной оценке у животных моторных функций и равновесия по шкале Combs и D'Alecy статистически значимые отличия в динамике неврологической симптоматики были отмечены только в группах животных, получавших магния и лития оксибутират в дозе 150 и 200 мг/кг, а также кавинтон. Таким образом, указанные соединения обладают более выраженной церебропротекторной активностью, чем препараты сравнения пирацетам, пикамилон и магния сульфат.

3.3 Влияние однократного профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность поведенческого дефицита у животных, подвергшихся необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Анализ поведенческих изменений и когнитивной функции после моделирования ишемического повреждения головного мозга у животных позволяет косвенно оценить наличие и выраженность церебропротекторного эффекта у исследуемых соединений. Исследование поведенческой и мнестических функций у животных в тестах ОП, УРПИ и ТЭИ проводилось через 72 часа после окклюзии общих сонных артерий.

В группе контрольных ишемизированных животных было зафиксирован статистически значимый более низкий показатель двигательной и ориентировочно исследовательской активности по сравнению с группой ложнооперированных животных (Таб. 6). В группах животных, которым вводили магния и натрия оксибутираты в дозе 150 мг/кг, лития оксибутират в дозе 150 и 200 мг/кг, а также кавинтон отмечались статистически значимые более высокие параметры двигательной активности по сравнению с группой животных, получавших пирацетам, пикамилон, магния сульфат и физиологический

раствор при $p < 0,05$. Данные соединения в других дозах не оказывали статистически значимого влияния на поведенческий признак в условиях ишемии.

Таблица 6

Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности у крыс после ишемии на фоне профилактического введения исследуемых соединений в тесте ОП

| Группы | | Количество пересеченных квадратов животными | Сумма количества ножек и стоек животных |
|--------------------------|-----------|---|---|
| Ложнооперированные | | 27,4±2,5* | 13,1±0,8* |
| Контроль-ишемия | | 6,0±0,9 | 3,2±0,5 |
| Mg-ГОМК | 100 мг/кг | 10,2±1,5 | 4,4±0,5 |
| | 150 мг/кг | 20,6±1,3* & # ^ | 10,9±1,1* & # ^ |
| | 200 мг/кг | 11,2±1,0 | 5,8±0,8 |
| Na-ГОМК | 100 мг/кг | 13,2±1,0 | 9,2±1,4 |
| | 150 мг/кг | 17,1±1,3* & # ^ | 10,1±0,9* & # ^ |
| | 200 мг/кг | 12,2±1,2 | 7,0±0,7 |
| Li-ГОМК | 100 мг/кг | 9,2±1,3 | 7,2±0,7 |
| | 150 мг/кг | 18,8±2,0* & # ^ | 10,4±0,9* & # ^ |
| | 200 мг/кг | 17,1±2,3* & # ^ | 9,2±0,7 |
| Пирацетам 800 мг/кг | | 8,4±1,77 | 4,6±0,4 |
| Пикамилон 100 мг/кг | | 9,3±0,5 | 4,0±0,4 |
| Магния сульфат 300 мг/кг | | 7,3±0,7 | 3,2±0,5 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | | 20,1±1,4* & # ^ | 9,9±0,9* & # ^ |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; & - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой, получавшей пирацетам; # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой, получавшей пикамилон; ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой, получавшей магния сульфат (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

Параметры ориентировочно-исследовательской активности у животных, получавших магниевую, литиевую и натриевую соль гамма-оксималяной кислоты в дозах 150 мг/кг и препарат сравнения кавинтон были статистически значимо выше чем в группах животных, получавших пирацетам, пикамилон, магния сульфат и физиологический раствор при $p < 0,05$.

3.4 Влияние однократного профилактического введения различных доз солей гамма-оксималяной кислоты на выраженность мнестического дефи-

цита животных, подвергшихся необратимой окклюзии общих сонных артерий головного мозга.

Сохранность памятного следа после ишемического поражения головного мозга представляет собой показатель, позволяющий косвенно оценить тяжесть развития неврологического дефицита. Сохранность памятного следа о электроболевым раздражении у животных, перенесших билатеральную окклюзию общих сонных артерий, изучалась в тесте УРПИ. Результаты при обучении навыка перед нанесением повреждения во всех группах статистически значимо не различались (Таб. 7). Однако воспроизведение ишемии головного мозга у крыс приводило к снижению показателей мнестической активности у животных контрольной по сравнению с группой ложнопериорированных животных, что выражалось в увеличении доли животных, зашедших в отсек и, следовательно, нарушении воспроизведения выработанного навыка через 72 часа и через неделю.

В группах животных получавших магния и лития оксибутираты в дозах 150 и 200 мг/кг меньше 30% от общего количества животных зашли в отсек через 72 часа. Через 7 дней после моделирования патологии статистически значимое сохранение памятного следа относительно показателей контрольной группы отмечалось в группах животных, получавших оксибутират магния, оксибутират лития и кавинтон, количество животных зашедших в темный отсек составили 37,5, 50 и 50% соответственно.

В тесте ТЭИ изучалось способность исследуемых соединений сохранять памятный след о способе избегания аверсивной среды животными после перенесенной билатеральной окклюзии сонных артерий через 72 часа и 7 дней. Ишемическое повреждение головного мозга приводило к нарушению сохранности памятного следа, что выражалось в статистически значимом удлинении латентного периода решения экстраполяционной задачи животными, получавшими физиологический раствор в сравнении с животными ложнопериорированной группы через 72 часа и неделю соответственно (Таб. 8).

Введение исследуемых соединений, магния оксибутирата во всех дозах и лития оксибутирата в дозе 200 мг/кг, приводило к статистически значимому уменьшению времени решения задачи по сравнению с животными контрольной группы при воспроизведении теста через 3 суток после моделирования. Эти изменения были сопоставимы с препаратом позитивного контроля кавинтон. Через 7 дней после моделирования окклюзии в группах получавших магния, натрия и лития оксибутираты, животные также статистически значимо быстрее решали задачу в ТЭИ, чем контрольные животные при $p < 0,05$.

Таблица. 7

Количество животных, вошедших в темный отсек при обучении и после перенесенной ишемии головного мозга на фоне профилактического введения исследуемых соединений в тесте УРПИ

| Группы | Обучение | | 72 часа | | 7 дней | | |
|-------------------------|-----------|---------|---------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| | N/n | % | N/n | % | N/n | % | |
| Ложнооперированные | 10 / 10 | 100 | 0 / 10 | - | 0 / 10 | - | |
| Контроль-ишемия | 20/ 20 | 100 | 5 / 6 # | 83,3 | 6 / 6 # | 100 | |
| Mg-ГОМК | 100 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 4 / 5 | 80 | 3 / 5 | 60 |
| | 150 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 2 / 8 * | 25 * | 3 / 8 * | 37,5 * |
| | 200 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 3 / 6 | 50 | 4 / 6 | 66,66 |
| Na-ГОМК | 100 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 3 / 6 | 50 | 4 / 6 | 66,66 |
| | 150 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 3 / 7 | 42,8 | 4 / 7 | 57,14 |
| | 200 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 2 / 5 | 40 | 4 / 5 | 80 |
| Li-ГОМК | 100 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 5 / 5 | 100 | 3 / 5 | 60 |
| | 150 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 1 / 5 * | 20 * | 3 / 5 | 60 |
| | 200 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 1 / 8 * | 12,5 * | 4 / 8 * | 50 * |
| Пирацетам 800 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 5 / 5 | 100 | 5 / 5 | 100 | |
| Пикамилон 100 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 4 / 4 | 100 | 4 / 4 | 100 | |
| Магния сульфат 300мг/кг | 10 / 10 | 100 | 5 / 6 | 83,3 | 6 / 6 | 100 | |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 3 / 8 | 37,5 | 4 / 8 * | 50 * | |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, N-число животных, зашедших в темный отсек; n – число животных в группе * - достоверно по отношению к контрольной группе животных при $p < 0,05$, # - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных при $p < 0,05$ (односторонний точный Критерий Фишера)

Таким образом, соединения магния, лития и натрия оксибутираты способствовали сохранению, ориентировочно-исследовательской активности, а также памятного следа после перенесенной ишемии головного мозга. По выраженности указанных эффектов более активными оказались магния оксибутират в дозе 150 мг/кг, лития оксибутират в дозе 200 мг/кг. В этих дозах данные соединения статистически значимо по церебропротективному действию превосходили пирацетам, пикамилон, магния сульфат и оказывали сопоставимое по выраженности действие с препаратом кавинтон.

Таблица 8

Латентный период решения экстраполяционной задачи животными в тесте ТЭИ при обучении и после необратимой окклюзии общих сонных артерий на фоне профилактического введения исследуемых соединений, секунды

| Группы | | Обучение | 72 часа | 7 дней |
|-------------------------|-----------|----------|----------------------------|----------------------------|
| Ложнооперированные | | 64,4±4,9 | 12,2±1,7** | 49,4±2,9 |
| Контроль-ишемия | | 52,8±3,9 | 64,3±6,4# | 123,0±11,7# |
| Mg-ГОМК | 100 мг/кг | 58,7±3,1 | 25,4±2,4* & # ^ | 82,2±6,9 |
| | 150 мг/кг | 60,3±6,4 | 19,1±1,3* & # ^ | 43,0±3,2* & # ^ |
| | 200 мг/кг | 56,4±2,3 | 21,2±1,9* & # ^ | 86,3±5,8 |
| Na-ГОМК | 100 мг/кг | 61,7±6,5 | 48,2±4,7 | 59,2±2,7* |
| | 150 мг/кг | 54,5±3,6 | 56,4±2,6 | 61,4±2,4 |
| | 200 мг/кг | 55,5±4,8 | 62,2±2,6 | 90,0±6,1 |
| Li-ГОМК | 100 мг/кг | 68,5±7,5 | 60,8±5,8 | 94,2±7,4 |
| | 150 мг/кг | 60,8±6,6 | 56,2±6,7 | 94,6±7,3 |
| | 200 мг/кг | 51,9±5,3 | 39,0±3,9* & # ^ | 42,3±2,1* & # ^ |
| Пирацетам 800 мг/кг | | 55,7±5,6 | 55,4±4,5 | 74,6±2,5 |
| Пикамилон 100 мг/кг | | 61,0±4,7 | 62,0±2,9 | 63,5±4,5 |
| Магния сульфат 300мг/кг | | 56,4±4,6 | 65,5±2,6 | 71,0±2,3 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | | 52,9±4,4 | 23,8±2,5* & # ^ | 48,1±3,4* & # ^ |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; & - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой, получавшей пирацетам; # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой, получавшей пикамилон; ^ - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой, получавшей магния сульфат (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна)

3.5 Заключение.

Профилактическое введение магния и лития оксибутиратов в дозах 150 и 200 мг/кг соответственно, а также кавинтона статистически значимо уменьшало летальность экспериментальных животных после ишемии головного мозга к 72 часу наблюдения по сравнению с животными контрольной группы. У животных этих групп отмечались менее выраженная неврологическая симптоматика и моторные нарушения к 72 часам от момента моделирования, которая выражалась в статистически значимо более низком балле по шкале McGraw и более высоком балле по шкале Combs и D'Alecy относительно животных, получавших физиологический раствор, пирарцетам, пикамилон и магния сульфат.

Под влиянием исследуемых соединений статистически значимо снижались нарушения локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности относительно контрольной группы животных, а также получавших пирарцетам, пикамилон и магния сульфат. Кроме того, в группах животных, получавших магния и лития оксибутират, а также кавинтон в указанных дозах, были менее выражены постишемическое нарушения памяти.

Исследуемые соединения магния оксибутират в дозе 150 мг/кг и лития оксибутират в дозе 200 мг/кг не уступали препарату сравнения кавинтон, однако, по сравнению с пирарцетамом, пикамилоном и сульфатом магния, они обладали более выраженными церебропротективными свойствами, выражавшиеся в более низком снижении летальности и нарастания психоневрологического, моторного и мнестического дефицита.

Глава 4. Церебропротекторный эффект однократного профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты при гравитационной ишемии головного мозга у крыс.

Известно, что продольные гравитационные перегрузки вызывают нарушение кровоснабжения головного мозга, тяжесть и характер которых зависит от величины и продолжительности радиальных ускорений. Краниокаудальный вектор ускорения препятствует притоку крови к головному мозгу, возникает ишемия в результате падения артериального давления во всех мозговых сосудах. Так по данным М.Д. Гаевого [21] давление в сонных артериях снижается до нулевого уровня при ускорении уже в 4g в краниокаудальном векторе у наркотизированных крыс. Таким образом, метод моделирования ишемии головного мозга путём гравитационных перегрузок имеет ряд преимуществ, так как, во-первых, не требует проведения наркотизации животных и оперативного вмешательства, а во-вторых, максимально приближен к клинической картине ишемического поражения головного мозга [42].

4.1 Влияние профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выживаемость животных после преходящей ишемии головного мозга у крыс.

После воспроизведения гравитационной ишемии у животных во всех экспериментальных группах отмечалась летальность, которая составила от 10% до 30% от численности группы (Таб. 9). Статистически значимых различий в выживаемости животных обнаружено не было, однако в группах животных, получавших магния оксибутират в дозе 150 мг/кг, натрия оксибутират в дозах 100 и 150 мг/кг, а также лития оксибутират в дозе 200 мг/кг летальности не наблюдалось.

Таблица 9

Выживаемость животных после проходящей ишемии, вызванной острой девятикратной гравитационной перегрузкой в кранио-каудальном направлении.

| Группа | | Выживаемость животных после проходящей переднемозговой ишемии | |
|-------------------------|-----------|---|------------|
| | | N/n | % выживших |
| Контроль-ишемия | | 7/3 | 70 |
| Mg-ГОМК | 100 мг/кг | 8/2 | 80 |
| | 150 мг/кг | 10/0 | 100 |
| | 200 мг/кг | 9/1 | 90 |
| Na-ГОМК | 100 мг/кг | 10/0 | 100 |
| | 150 мг/кг | 10/0 | 100 |
| | 200 мг/кг | 8/2 | 80 |
| Li-ГОМК | 100 мг/кг | 8/2 | 80 |
| | 150 мг/кг | 9/1 | 90 |
| | 200 мг/кг | 10/0 | 100 |
| Пирацетам 800 мг/кг | | 8/2 | 80 |
| Пикамилон 100 мг/кг | | 8/2 | 80 |
| Магния сульфат 300мг/кг | | 8/2 | 80 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | | 9/1 | 90 |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, N - число выживших животных; n - число погибших животных.

4.2 Влияние профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность неврологического дефицита животных после проходящей ишемии головного мозга у крыс.

Продольные радиальные ускорения вызывают явления стойкого неврологического дефицита и нарушение поведенческих реакций у животных, что является следствием комбинации ишемического и стрессорного поражения головного мозга. При этом целый ряд стрессогенных факторов, такие как эмоциональный дискомфорт, обусловленный иммобилизацией в пеналах центрифуги, шумовые эффекты установки и пространственная дезориентация, оказывают неблагоприятное воздействие на животного. При этом оценка неврологических симптомов и простейших поведенческих реакций даёт воз-

возможность оценить выраженность церебропротекторной активности у исследуемых соединений и препаратов сравнения. [40]

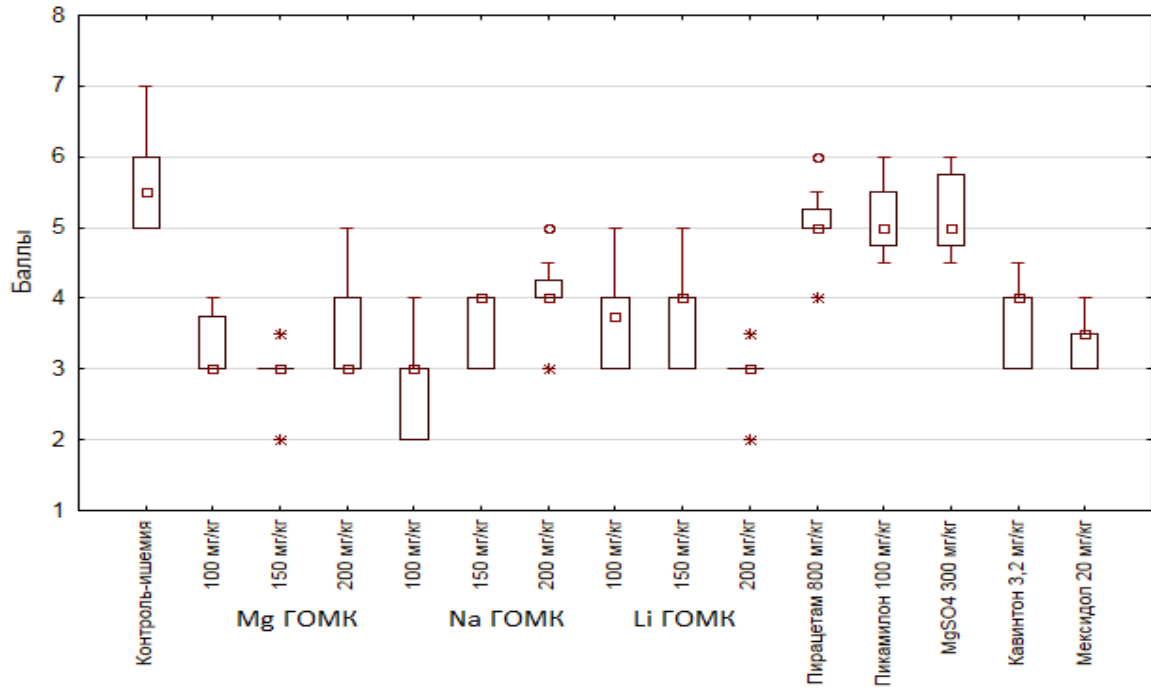
Моделирование ишемического повреждения головного мозга животных с помощью центрифуги приводило к появлению неврологического дефицита различной степени тяжести (Рис. 5А). Так при оценке животных контрольной группы по шкале McGraw было установлено, что 50% значений лежат в пределах от 5 до 6 баллов, у них преобладали парезы и параличи одной или нескольких конечностей, манежные движения, вялость, тремор. На рис. 5А видно, что в группах животных, получавших исследуемые соединения, отмечались более низкие баллы неврологического дефицита. Однако только в группах животных, получавших магния, натрия и лития оксибутираты в дозах 150, 100 и 200 мг/кг были зафиксированы наименьшие баллы, 50% значений которых лежали в диапазоне от 2 до 3, что говорит о наличии у животных более легкой неврологической симптоматики: манежности движений, вялости и тремора.

При оценке неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy было отмечено наличие у контрольной группы животных выраженного моторного дефицита, так 50% значений баллов находилось в пределах от 2 до 4,5, что говорит о неспособности большинства животных удерживаться на экране-сетке, стержне и нейлоновой веревке. В группах животных, получавших магния и лития оксибутират в дозах 150 и 200 мг/кг соответственно, было отмечено самое большое значение медианы в 7 баллов, при этом диапазон 50% значений составлял от 6 до 8 баллов. Таким образом, животные этих групп обладали более выраженными моторными навыками, чем животные контрольной группы.

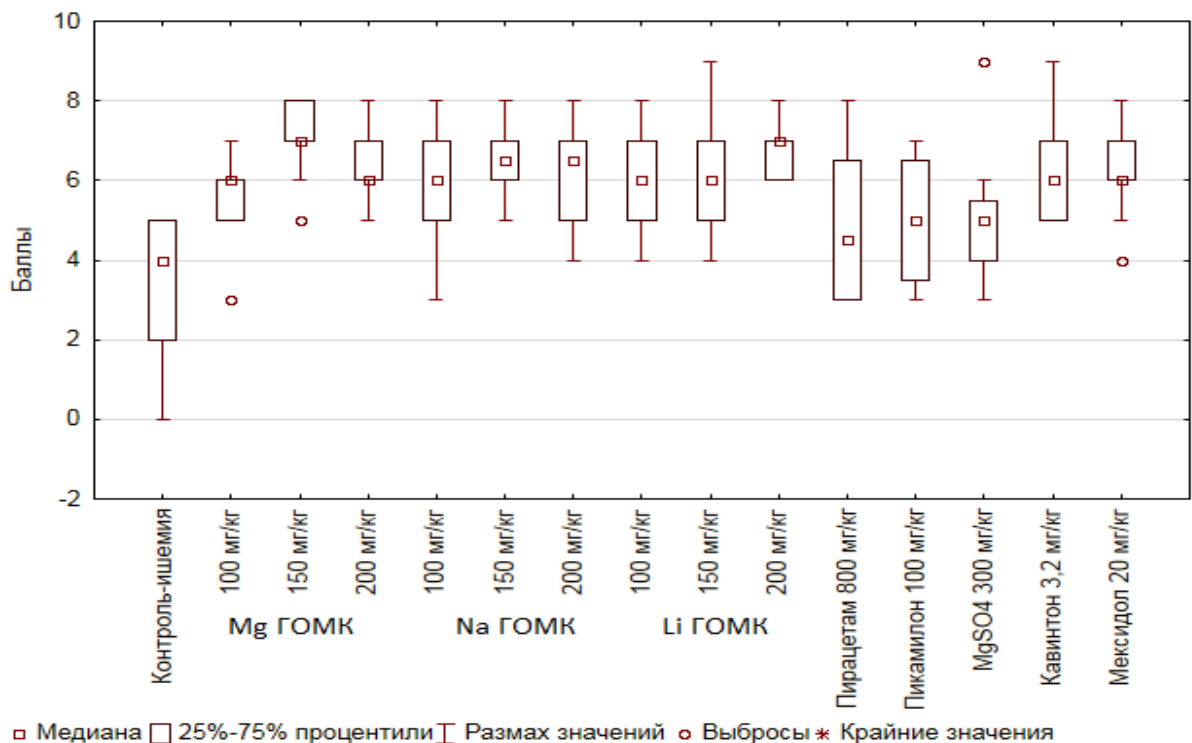
Таким образом, по результатам оценки неврологического дефицита по обеим шкалам было выявлено наличие выраженной церебропротекторной активности у соединений магния и лития оксибутиратов в дозах 150 и 200 мг/кг. У животных этих групп отмечались самые низкие баллы неврологиче-

ского дефицита и более высокий уровень моторной деятельности конечностей.

А



Б



□ Медиана □ 25%-75% процентиля I Размах значений ○ Выбросы * Крайние значения

Рис. 5. Выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw (А) и Combs (Б) у животных после проходящей ишемии головного мозга на фоне профилактического введения исследуемых соединений.

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират,

4.3 Влияние профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность поведенческого дефицита у животных после преходящей ишемии головного мозга у крыс.

В тесте ОП была проведена оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных, перенесших гравитационную ишемию. Двигательная активность существенно снижалась во всех экспериментальных группах относительно интактных животных, однако, наибольшее снижение наблюдалось в группе контроль-ишемия ($3,8 \pm 0,3$) (Таб. 12).

Из всех исследуемых соединений способностью статистически значимо препятствовать снижению двигательной активности у животных на фоне перенесенной ишемии оказали соединения магния оксибутират в дозе 150 мг/кг, натрия оксибутират в дозе 100 мг/кг при $p < 0,05$ по сравнению с показателями контрольной группы.

При оценке ориентировочно-исследовательской активности также наблюдалось снижение показателей во всех группах относительно интактных животных. В контрольной группе животных по-прежнему наблюдалось самое большое снижение данного показателя ($1,1 \pm 0,3$) (Таб. 10). У животных, которым вводили соединения магния и лития оксибутираты отмечались статистически значимые более высокие показатели ориентировочно-исследовательской активности по сравнению с контрольной группой животных при $p < 0,05$. В группах животных, получавших препараты сравнения пираретам, пикамилон, магния сульфат и кавинтон, изменение показателей активности не имело статистической значимости.

Таким образом, профилактическое введение исследуемых соединений магния, лития оксибутиратов в дозах 150 мг/кг и 200 мг/кг соответственно приводило к статистически значимому снижению поведенческого дефицита животных на фоне перенесенной ишемии, относительно животных, получавших физиологический раствор, пираретам, пикамилон и магния сульфат.

4.4 Влияние профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность мнестического дефицита у животных после переходящей ишемии головного мозга у крыс.

Нарушение мнестического статуса животных является одним из маркеров неврологического дефицита и может использоваться для оценки тяжести последнего. Сохранение памятного следа у животных, перенесших переходящую ишемию, оценивалось в УРПИ и ТЭИ.

Таблица. 10

Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных в тесте ОП после перенесенной гравитационной ишемии на фоне профилактического введения исследуемых соединений

| Группы | | Количество пересеченных квадратов животными | Сумма количества норок и стоек животных |
|-------------------------|-----------|---|---|
| Интактные | | 19,7±1,4* | 8,4±0,7* |
| Контроль-ишемия | | 3,8±0,3 | 1,1±0,3 |
| Mg-ГОМК | 100 мг/кг | 7,9±1,0 | 2,90±0,4 |
| | 150 мг/кг | 12,6±1,4* | 5,4±0,4 * |
| | 200 мг/кг | 7,5±0,8 | 3,7±0,3 |
| Na-ГОМК | 100 мг/кг | 10,9±1,0* | 3,7±0,2 |
| | 150 мг/кг | 7,1±0,6 | 3,3±0,4 |
| | 200 мг/кг | 6,2±0,4 | 3,4±0,3 |
| Li-ГОМК | 100 мг/кг | 8,0±1,0 | 3,8±0,4 |
| | 150 мг/кг | 7,1±0,5 | 4,4±0,2* |
| | 200 мг/кг | 10,6±1,3* | 4,3±0,3* |
| Пирацетам 800 мг/кг | | 4,9±0,6 | 2,6±0,4 |
| Пикамилон 100 мг/кг | | 5,2±0,2 | 2,7±0,4 |
| Магния сульфат 300мг/кг | | 4,1±0,8 | 1,4±0,3 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | | 8,0±1,0 | 3,1±0,4 |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

В тесте УРПИ животные, подвергшиеся воздействию гравитационной ишемии, теряли памятный след о наносимом воздействии и совершали входы в темный отсек при воспроизведении навыка как через 72 часа, так и через 7 дней после нанесения ишемического повреждения (Таб. 11).

Введение магния и лития оксибутиратов в дозах 150 и 200 мг/кг соответственно приводило к статистически значимому снижению количества заходов животными, перенесшими преходящую ишемию, в темный отсек при воспроизведении навыка в УРПИ через 72 часа по сравнению с показателями контрольной группы животных. Через неделю было также отмечено сохранение памятного следа у животных, которые получали магния и лития оксибутираты в дозе 150 и 200 мг/кг.

Таблица 11

Количество животных, вошедших в темный отсек при обучении и после перенесенной гравитационной ишемии головного мозга на фоне профилактического введения исследуемых соединений в тесте УРПИ

| Группы | | Обучение | | 72 часа | | 7 дней | |
|-------------------------|-----------|----------|-----|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| | | N/n | % | N/n | % | N/n | % |
| Интактные | | 10 / 10 | 100 | 0 / 10 | - | 0 / 10 | - |
| Контроль | | 7 / 7 | 100 | 6 / 6 # | 100 | 6 / 6 # | 100 |
| Mg-ГОМК | 100 мг/кг | 8 / 8 | 100 | 5 / 8 | 62,5 | 6 / 8 | 75 |
| | 150 мг/кг | 9 / 9 | 100 | 3 / 9 * | 33,3 * | 4 / 9 * | 44,4 * |
| | 200 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 7 / 10 | 70 | 7 / 10 | 70 |
| Na-ГОМК | 100 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 5 / 10 | 50 | 6 / 10 | 60 |
| | 150 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 6 / 10 | 60 | 7 / 10 | 70 |
| | 200 мг/кг | 8 / 8 | 100 | 6 / 8 | 75 | 7 / 8 | 87,5 |
| Li-ГОМК | 100 мг/кг | 8 / 8 | 100 | 6 / 8 | 75 | 7 / 8 | 87,5 |
| | 150 мг/кг | 9 / 9 | 100 | 5 / 9 | 55,5 | 6 / 9 | 66,6 |
| | 200 мг/кг | 10 / 10 | 100 | 4 / 10 * | 40 * | 5 / 10 * | 50 * |
| Пирацетам 800 мг/кг | | 8 / 8 | 100 | 7 / 8 | 87,5 | 7 / 8 | 87,5 |
| Пикамилон 100 мг/кг | | 8 / 8 | 100 | 6 / 8 | 75 | 8 / 8 | 100 |
| Магния сульфат 300мг/кг | | 8 / 8 | 100 | 7 / 8 | 87,5 | 8 / 8 | 100 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | | 9 / 9 | 100 | 5 / 9 | 55,5 | 6 / 9 | 66,6 |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, N-число животных, зашедших в темный отсек; n – число животных в группе * - достоверно по отношению к контрольной группе животных при $p < 0,05$, # - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных при $p < 0,05$

Нанесение ишемического церебрального повреждения животным приводило к нарушению воспроизведения памятного следа о способе выполнения экстраполяционной задачи в условиях наличия аверсивной среды в ТЭИ. Так, животные контрольной группы через 72 часа после нанесения повреждения при воспроизведении навыка смогли решить задачу в среднем через $67,5 \pm 6,2$ секунд, что статистически значимо отличалось от показателей интактной группы животных ($11,1 \pm 1,1$) при $p < 0,05$ (Таб. 12). Через неделю эти изменения в показателях контрольной и интактной групп животных также носили статистически значимый характер.

Таблица 12

Латентный период подныривания животных в тесте ТЭИ при обучении и после перенесенной преходящей ишемии головного мозга на фоне профилактического введения исследуемых соединений

| Группы | | Обучение | 72 часа | 7 дней |
|--------------------------|-----------|----------------|--|---------------------------------------|
| Интактные | | $68,1 \pm 4,5$ | $11,1 \pm 1,1^{**}$ | $48,8 \pm 3,1^{**}$ |
| Контроль-ишемия | | $54,7 \pm 3,6$ | $67,5 \pm 6,2$ | $129,7 \pm 13,4$ |
| Mg-ГОМК | 100 мг/кг | $62,8 \pm 2,9$ | $29,4 \pm 3,2$ | $87,6 \pm 4,4$ |
| | 150 мг/кг | $62,5 \pm 6,9$ | $20,1 \pm 1,4^{*\wedge}$ | $48,1 \pm 2,5^*$ |
| | 200 мг/кг | $57,8 \pm 2,7$ | $22,7 \pm 2,0^{*\wedge}$ | $96,2 \pm 4,1$ |
| Na-ГОМК | 100 мг/кг | $63,9 \pm 6,2$ | $49,9 \pm 4,2$ | $68,5 \pm 2,4$ |
| | 150 мг/кг | $56,0 \pm 3,9$ | $54,9 \pm 2,8$ | $71,8 \pm 3,8$ |
| | 200 мг/кг | $52,5 \pm 4,9$ | $62,0 \pm 1,9$ | $95,0 \pm 5,8$ |
| Li-ГОМК | 100 мг/кг | $67,9 \pm 6,9$ | $61,5 \pm 4,1$ | $99,7 \pm 5,2$ |
| | 150 мг/кг | $64,8 \pm 5,3$ | $59,6 \pm 4,4$ | $95,2 \pm 4,2$ |
| | 200 мг/кг | $51,5 \pm 5,1$ | $41,9 \pm 3,2^*$ | $49,4 \pm 2,2^*$ |
| Пирацетам 800 мг/кг | | $60,1 \pm 5,4$ | $52,8 \pm 3,6$ | $74,8 \pm 1,7$ |
| Пикамилон 100 мг/кг | | $63,6 \pm 4,6$ | $60,6 \pm 2,7$ | $71,8 \pm 3,0$ |
| Магния сульфат 300 мг/кг | | $58,7 \pm 4,6$ | $65,7 \pm 3,1$ | $72,9 \pm 2,2$ |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | | $55,8 \pm 4,9$ | $26,2 \pm 2,5^{*\wedge}$ | $73,1 \pm 2,2$ |

Обозначения: Латентный период выражен в секундах, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; \wedge - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой получавшей магния сульфат (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

Результаты исследования показали, что способностью сохранять памятный след через 72 часа после моделирования ишемии обладали магния

оксибутират в дозах 150 и 200 мг/кг, лития оксибутират в дозе 200 мг/кг, а также кавинтон. В этих группах более низкое время решения задачи было статистически значимо относительно показателей животных, получавших магния сульфат и физиологический раствор при $p < 0,05$. Однако через неделю статистически значимый более низкий показатель времени решения задачи относительно контроля отмечался в группах животных, получавших магния и лития оксибутираты в дозах 150 и 200 мг/кг соответственно.

Таким образом, соединения магния, натрия и лития способствовали сохранению мнестического дефицита у большинства животных после перенесенной переходящей ишемии головного мозга. Данный эффект наиболее был выражен у соединения магния оксибутират в дозе 150 мг/кг и лития оксибутирата в дозе 200 мг/кг.

4.5. Заключение

Моделирование гравитационной ишемии приводило к формированию у животных неврологического, поведенческого и мнестического дефицита различной степени выраженности. Профилактическое введение магния и лития оксибутиратов в дозах 150 и 200 мг/кг соответственно статистически значимо препятствуют нарастанию неврологической симптоматики, выражающейся в достоверном снижении балла по шкале McGraw и повышением балла по шкале Combs и D'Alесу. Под влиянием исследуемых соединений достоверно снижались выраженные нарушения локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности животных. Кроме того, в группах животных, получавших исследуемые соединения в указанных дозах, были менее выражены постишемические нарушения памяти. Результаты исследования показали, что только магния и лития оксибутираты при оценке поведенческой и мнестической активности оказывали статистически значимый нейрорпотективный эффект как через 3 суток, так и через неделю после моделирования патологии.

Исследуемые соединения в наиболее активных дозах превосходили по показателям группы позитивного контроля пирацетам, пикамилон, магния сульфат и кавинтон. В других дозах эти соединения оказывали статистически незначимый эффект.

Таким образом, мы провели скрининг эффективности однократного профилактического введения различных доз солей гамма-оксимасляной кислоты на моделях ОСА и гравитационной ишемии. Наиболее эффективными по результатам скрининга на данных моделях оказались соединения магний оксибутират в дозе 150 мг/кг, натрия оксибутират в дозе 150 мг/кг и лития оксибутират в дозе 200 мг/кг. Далее будет осуществляться более детальное исследование церебропротекторной активности указанных доз исследуемых соединений.

Глава 5. Церебропротекторный эффект однократного лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании травмы головного мозга у крыс.

Модель травматического повреждения головного мозга животного позволяет наиболее полно воссоздать морфофункциональные изменения в мозговой ткани и во всем организме, аналогичные тем, которые встречаются в реальной клинической практике [82]. При этом она позволяет оценить наличие и выраженность церебропротекторных свойств исследуемых соединений.

5.1 Влияние лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на неврологический статус животных при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс.

Оценка неврологического дефицита животных на данной модели осуществлялась по неврологическим шкалам Combs и Garcia. Эта совокупность тестов позволяет комплексно подойти к оценке степени нарушений моторной и поведенческой функций у животных. Оценка показателей по неврологическим шкалам производилась через 1, 4 и 7 суток после моделирования травмы мозга.

Моделирование травматического повреждения головного мозга у животных приводило к появлению стойкого моторного дефицита, который проявлялся в нарушении координации движения, способности к выполнению моторной деятельности передних и задних конечностей, что выражалось в статистически значимом снижении баллов по шкале Combs по сравнению с группой ложноперирированных животных (Рис. 6А). На рис. 6А видно, что все группы животных, кроме ложноперирированных имеют приблизительно равное значение совокупного показателя от 4 до 5. Далее при оценке моторного дефицита через 4 и 7 суток после моделирования в группах животных, получавших магния и лития оксибутираты, отмечались самые высокие значения медианы по шкале Combs, которые составили 6 баллов, что говорит о наличии легких нарушений моторной деятельности у животных. Значения баллов

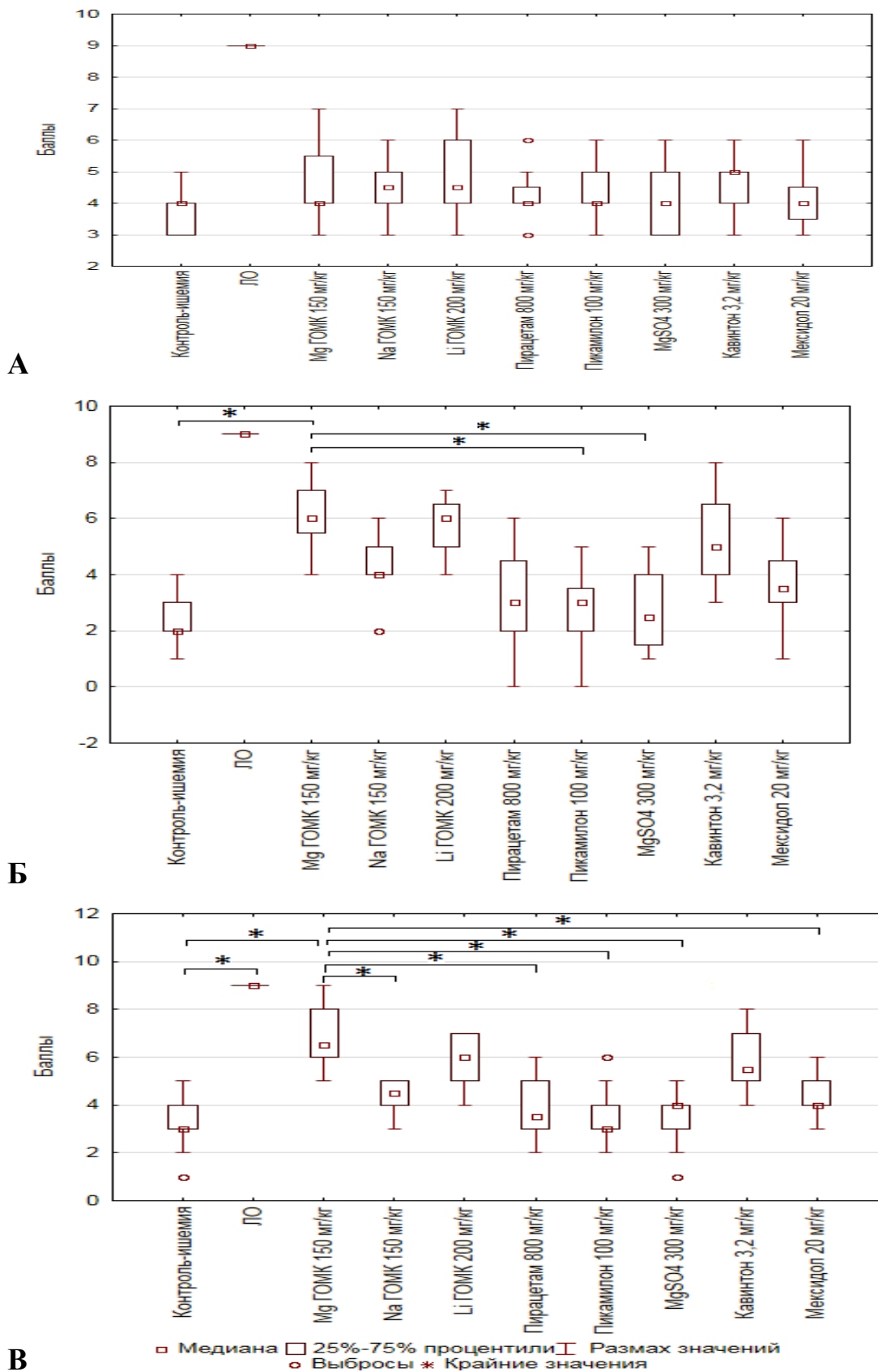


Рис. 6. Выраженность неврологического дефицита по шкале Combs у животных через 1 (А), 4 (Б) и 7 суток (В) после моделирования травмы головного мозга на фоне лечебного введения исследуемых соединений. Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксидобутират, Na-ГОМК - натрия оксидобутират, Li-ГОМК - лития оксидобутират

для групп животных, получавших пирацетам, пикамилон, мексидол и магния сульфат соответствуют группе контрольных животных. Стоит отметить, что верхнее значение диапазона для 50% животных, получавших оксибутират магния, достигало через 7 суток после моделирования травмы 8 баллов, что также говорит о почти полном восстановлении моторных функций у животных.

Оценка неврологического дефицита у животных по шкале Garcia позволяет выявить наличие и выраженность ассиметрических нарушений моторной и рецептивной функций у животного. Так через 1 сутки после моделирования травмы значения медиан баллов у всех групп животных были статистически значимо ниже, чем аналогичный показатель у группы ложнооперированных животных, что связано с нарушением симметрии движений и осязания у животных (Рис. 7А). Через 4 и 7 суток после воспроизведения травматического повреждения мозга у животных, получавших оксибутираты магния и лития отмечались более высокие показатели по шкале Garcia, диапазон которых составлял через 4 суток - 10-12 баллов, а через 7 суток - 13-15 баллов. Указанный диапазон для 50% животных говорит о снижении моторной и рецептивной ассиметрии у животных этих групп. Указанные значения баллов были самые большие среди всех групп.

Таким образом, более выраженное церебропротективное действие через 4 и 7 суток после моделирования травмы мозга было отмечено в группах животных, получавших магния и лития оксибутираты. У животных указанных групп была наименее выражен моторный дефицит, ассиметрия конечностей и проприорецепция тела. Среди всех препаратов сравнения повышение баллов также отмечалось в группе животных, получавших кавинтон, но диапазон данных находится гораздо ниже, чем в указанных выше группах животных. Значения медиан баллов животных, получавших пирацетам, пикамилон, мексидол и магния сульфат соответствовали группе контрольных животных.

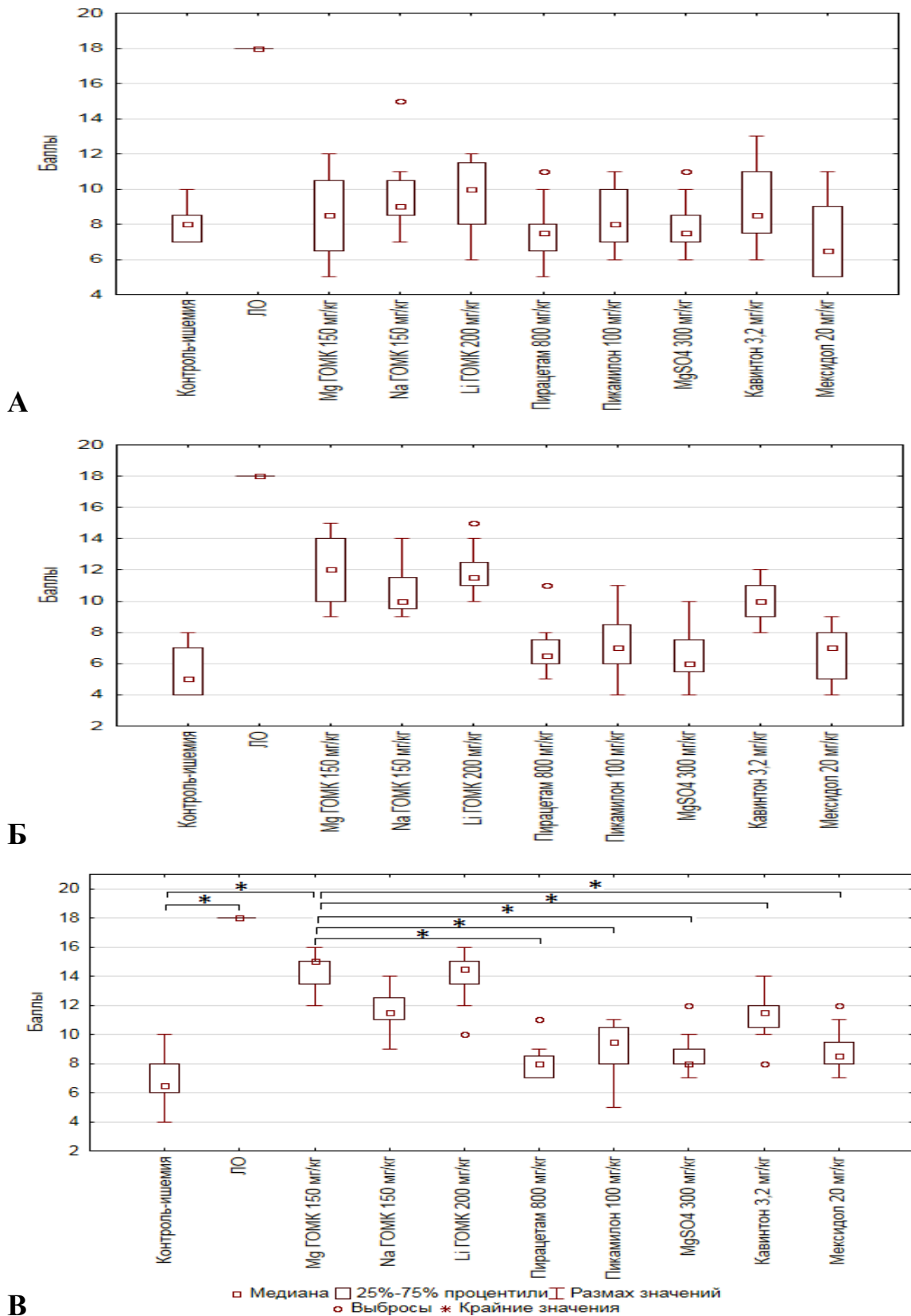


Рис. 7. Выраженность неврологического дефицита по шкале Garcia у животных через 1 (А), 4 (Б) и 7 суток (В) после моделирования травмы головного мозга на фоне лечебного введения исследуемых соединений. Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират

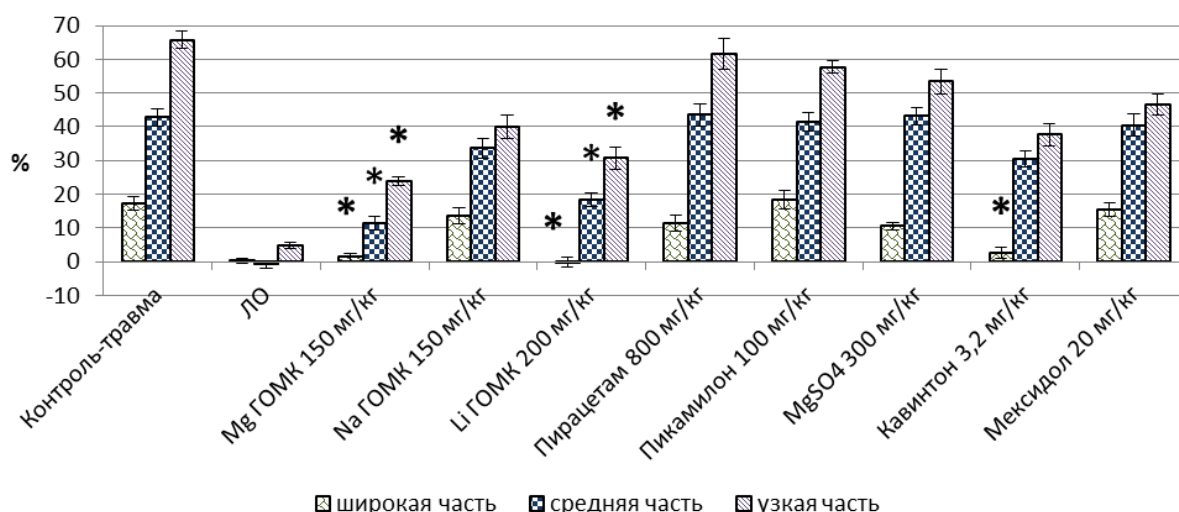
5.2 Влияние лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит у животных, вызванный моделированием травматического повреждения головного мозга у крыс.

5.2.1. Влияние лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит у животных в тесте «Сужающаяся дорожка» («Balance-beam test»).

Тесты «сужающаяся дорожка» [207] или «Balance-beam test» является одним из наиболее чувствительных и объективных методов оценки тяжести ассиметрических моторных нарушений у животных с односторонним повреждением головного мозга. По мере усложнения задачи по преодолению дорожки, увеличивается количество ошибок конечности контралатеральной стороне повреждения полушария мозга, совершаемых животным при прохождении теста, и соответственно возрастает процент ассиметрии в положительную сторону [207]. Однако на разных этапах наблюдения степень развития отека головного мозга животных различается, что находит отражение на показателе ассиметрии.

После моделирования отека головного мозга было отмечено, что средний показатель ассиметрии контрольных животных имел максимальные значения через 4 суток после повреждения, и составлял примерно 20, 40 и 65% для каждого из участков дорожки (Рис.8А). Через 7 суток после нанесения повреждения этот показатель контрольной группы немного снизился, что говорит о вероятном снижении тяжести моторного дефицита. В группах животных, которые получали оксибутираты магния и лития, через 4 суток после травмы отмечалось статистически значимое снижение процента ассиметрии на всех участках дорожки относительно показателя контрольной группы, а также животных получавших пирарцетам, пикамилон и магния сульфат. В группе животных, получавших кавинтон, было отмечено статистически значимое снижение показателя только на узком участке по сравнению с контрольной группой животных. Через 7 суток после моделирования травмы

А



Б

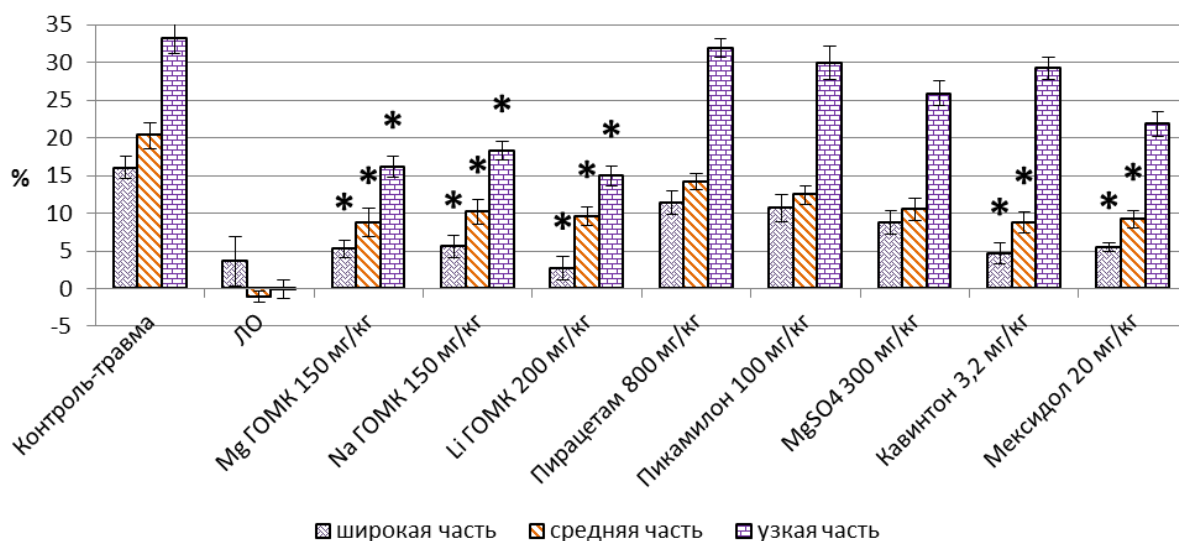


Рис. 8 Процент ассиметрии у животных в Balance-beam test на различных участках пути дорожки через 4 (А) и 7 суток (Б) после моделирования травмы головного мозга на фоне лечебного введения исследуемых соединений, %.

Обозначения: ЛО - ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

статистически значимое снижение ассиметрии на всех участках дорожки фиксировалось в группах животных, которым вводили магния, натрия и лития оксибутираты. Препараты сравнения кавинтон и мексидол оказались статистически значимо эффективны только на первых двух участках дорожки.

5.2.2. Влияние лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит у животных в тесте «Staircase test»

«Тест лестница» («Staircase test») [182] позволяет достаточно точно оценить нарушение мелкой моторики конечностей у животных в результате нарушения функционирования разных отделов головного мозга животного (Montoya, 1991). В этом тесте было проведено исследование введения исследуемых соединений на сенсомоторный дефицит в результате создания травмы головного мозга у животных.

Количество собранных зерен животными контрольной группы при воспроизведении навыка через 7 суток после создания травмы резко было статистически значимо ниже ($7,2 \pm 0,4$ для контрлатеральной стороны и $3,4 \pm 1,1$ для ипсилатеральной), чем у ложноперирированных животных при $p < 0,05$ ($8,8 \pm 1,2$ и $9,1 \pm 1,4$ соответственно) (Рис. 9). Введение соединений магния, натрия и лития оксибутиратов, а также препарата сравнения кавинтон приводило к статистически значимому повышению количества собранных зерен обеими конечностями.

По результатам теста лестница статистически значимое снижение сенсомоторного дефицита конечностей у крыс было обнаружено у животных, которые получали магния, натрия и лития оксибутират, а также препарат сравнения кавинтон. Однако в тесте дорожка только введение оксибутиратов магния и лития было связано со статистически значимым снижением показателя ассиметрии на всех участках планки, что было отмечено через 4 и 7 суток после создания травмы мозга. Таким образом, препараты магния и лития оксибутираты оказывали выраженное церебропротективное действие при травме мозга как на 4, так и на 7 сутки, которое позволило предотвратить развитие моторно-ассиметрических нарушений.

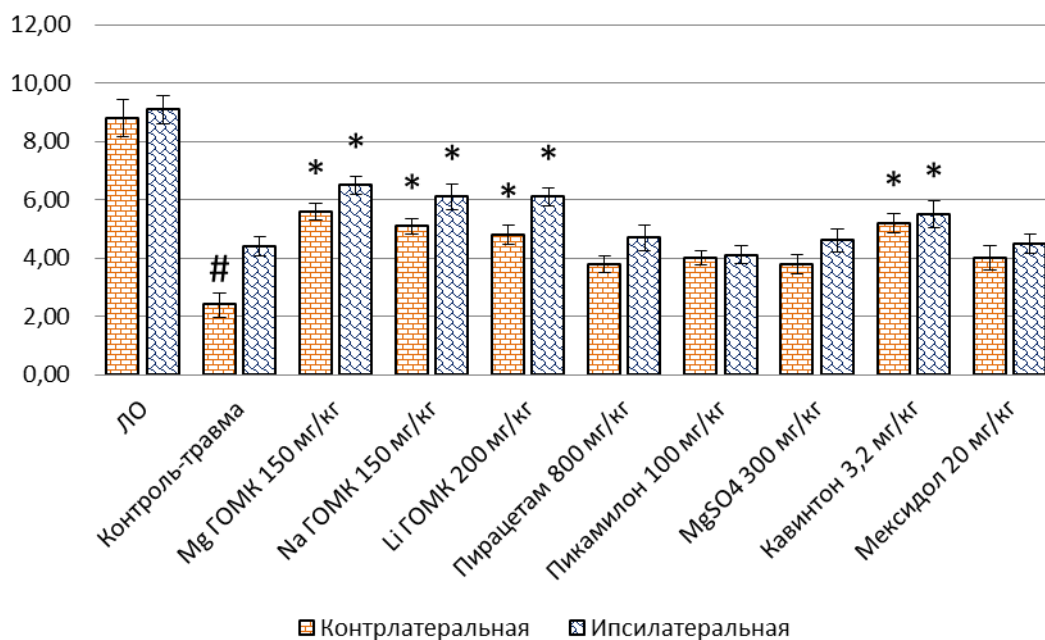


Рис. 9 Количество зерен, собранных животными контролатеральной и ипсилатеральной конечностью через 7 суток после моделирования травмы головного мозга.

Обозначения: ЛО - ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; # - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с показателем для ипсилатеральной конечности (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса).

5.3. Влияние лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на поведенческий статус животных при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс.

В тесте ОП была проведена оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных с моделируемой травмой головного мозга. Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности группы контрольных животных составили $4,4 \pm 0,4$ и $4,4 \pm 0,4$ соответственно, что статистически значимо ниже таковых у ложнооперированных животных ($15,6 \pm 1,7$ и $6,1 \pm 0,4$ соответственно) при $p < 0,05$ (Таб. 13).

Таблица. 13

Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных с травмой головного мозга в тесте ОП через 7 суток после моделирования травмы мозга на фоне лечебного введения исследуемых соединений

| Группы | Количество пересеченных квадратов животными | Сумма количества норок и стоек животных |
|-------------------------|---|---|
| Ложнооперированные | 15,6±1,7* | 6,1±0,4* ^ |
| Контроль-травма | 4,4±0,4 | 1,5±0,2 |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 11,4±0,7 *^# | 4,4±0,5 * |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 6,7±0,9 | 4,2±0,5* |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 10,2±0,8 *^# | 5,5±0,3 * |
| Пирацетам 800 мг/кг | 5,3±0,6 | 2,4±0,3 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 5,6±0,7 | 3,5±0,4 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 7,2±0,7 | 2,6±0,3 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 10,1±0,7*^# | 5,0±0,5 * |
| Мексидол 20мг/кг | 6,7±0,8 | 3,0±0,4 |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с шемизированной группой контрольных животных; & - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой, получавшей пирацетам; # - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой, получавшей пикамилон; ^ - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой, получавшей магния сульфат (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

Отмечено, что в группах животных получавших магния оксибутират (11,4±0,7), натрия оксибутирата (7,6±1,2), лития оксибутирата (10,2±0,8), а также препарат сравнения кавинтон (10,1±0,7), показатель двигательной активности статистически значимо превышал таковой в группе контрольных животных. Анализируя результаты показателей ориентировочно-исследовательской активности, достоверное повышение отмечается в группах животных, получавших магния оксибутират (4,4±0,5), натрия оксибутирата (4,2±0,5), лития оксибутирата (5,5±0,3) и препарат кавинтон (5,0±0,5) при $p < 0,05$.

Таким образом, вышеуказанные исследуемые соединения оказывают превентивное действия в отношении развития поведенческого дефицита у крыс при моделировании травмы головного мозга.

5.4 Влияние лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на мнестический статус животных при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс.

Сохранение памятного следа у животных, перенесших травму головного мозга, оценивалось в УРПИ и ТЭИ. При воспроизведении навыка пассивного избегания в УРПИ через 72 часа после воспроизведения травмы головного мозга было выявлено статистически значимое увеличение числа входов животными в темный отсек по сравнению группой ложнооперированных животных, что связано с нарушением памятного следа о наличии повреждающего фактора. В группах животных, получавших магния оксибутират и лития оксибутираты отмечено статистически значимое снижение количества заходов относительно показателя контрольных животных при $p < 0,05$ (Таб.14).

Таблица. 14

Количество входов в темный отсек в тесте УРПИ, совершенных животными во время обучения и через 72 часа и 7 суток после травмы головного мозга при лечебном введении исследуемых соединений

| Группы | Обучение | | 72 часа | | 7 дней | |
|-------------------------|----------|-----|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| | N/n | % | N/n | % | N/n | % |
| Ложнооперированные | 12 / 12 | 100 | 0 / 12 | - | 0 / 12 | - |
| Контроль-травма | 12 / 12 | 100 | 12 / 12 # | 100 | 12 / 12 # | 100 |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 5 / 12 * | 41,6 * | 7 / 12 * | 58,3 * |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 8 / 12 | 66,6 | 12 / 12 | 100 |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 6 / 12 * | 40 * | 7 / 12 * | 58,3 * |
| Пирацетам 800 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 8 / 12 | 66,6 | 11 / 12 | 91,6 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 10 / 12 | 83,3 | 11 / 12 | 91,6 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 12 / 12 | 100 | 11 / 12 | 91,6 | 12 / 12 | 100 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 8 / 12 | 66,6 | 8 / 12 | 66,6 |
| Мексидол 20мг/кг | 12 / 12 | 100 | 8 / 12 | 66,6 | 9 / 12 | 75 |

Обозначения: N-число животных, зашедших в темный отсек; n – число животных в группе, ЛО-ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - достоверно по отношению к контрольной группе животных при $p < 0,05$, # - достоверно по отношению к группе ложнооперированных животных при $p < 0,05$ (Критерий χ^2)

Через 7 дней после моделирования травмы большинство животных, получивших оксибутираты магния и лития не заходили в отсек, что связано с сохранением у них памятного следа об электроболевом раздражении.

Моделирование травмы головного мозга у крыс приводило к нарушению воспроизведения памятного следа о способе выполнения экстраполяционной задачи в ТЭИ. Так, животные контрольной группы через 72 часа после нанесения повреждения при воспроизведении навыка смогли решить задачу в среднем через $103,1 \pm 6,2$ секунды, что статистически значимо выше чем показатели ложнооперированной группы животных ($26,7 \pm 3,4$) при $p < 0,05$ (Таб. 15). Через неделю эта статистически значимая разница в показателях контрольной ($120,2 \pm 8,9$) и интактной групп ($45,6 \pm 4,6$) животных сохранилась, что говорит о последующем снижении мнестической активности у животных с травмой.

Таблица 15

Латентный период подныривания животных в тесте ТЭИ во время обучения и через 4 и 7 суток после травмы головного мозга при лечебном введении исследуемых соединений

| Группы | Обучение | Воспроизведение 4 дня | Воспроизведение 7 дней |
|--------------------------|----------------|--|--|
| Ложнооперированные | $67,5 \pm 5,9$ | $26,7 \pm 3,4$ * | $45,6 \pm 4,6$ * |
| Контроль-травма | $58,2 \pm 4,6$ | $103,1 \pm 6,2$ | $120,2 \pm 8,9$ |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | $63,1 \pm 6,1$ | $36,9 \pm 4,5$ * & ^ | $68,2 \pm 6,0$ * & ^ |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | $71,2 \pm 6,5$ | $58,0 \pm 4,1$ * | $89,3 \pm 5,9$ |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | $78,3 \pm 4,4$ | $60,2 \pm 6,6$ * | $84,2 \pm 6,4$ * |
| Пирацетам 800 мг/кг | $65,2 \pm 6,2$ | $89,5 \pm 7,6$ | $110,9 \pm 9,1$ |
| Пикамилон 100 мг/кг | $61,3 \pm 5,6$ | $81,5 \pm 8,4$ | $110,4 \pm 6,7$ |
| Магния сульфат 300 мг/кг | $68,1 \pm 5,7$ | $86,3 \pm 6,9$ | $104,9 \pm 6,5$ |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | $67,9 \pm 9,7$ | $65,2 \pm 6,5$ * | $90,2 \pm 6,4$ |
| Мексидол 20 мг/кг | $66,6 \pm 7,5$ | $65,0 \pm 8,6$ * | $102,4 \pm 8,0$ |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; & - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с животными, получавшими кавинтон; ^ - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с животными, получавшими мексидол (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

При воспроизведении навыка через 4 суток после травмы в группах животных, получавших магния (36,9±4,5), натрия (58,0± 4,1) лития оксибутираты (60,2±6,6), а также препараты сравнения кавинтон (65,2±6,5) и мексидол (65,0±8,6) отмечались более низкие показатели времени решения задачи в ТЭИ. При этом время решения задачи у животных, получавших магния оксибутират, был статистически значимо ниже, чем у животных, получавших все препараты сравнения, включая мексидол и кавинтон. Через 7 дней после моделирования травмы мозга статистически значимые более низкие значения времени подныривания были зафиксированы в группах животных, получавших оксибутираты магния и лития.

Таким образом, исследуемые соединения и в большей степени магния и лития оксибутираты оказывали протективное влияние на развитие поведенческого и мнестического дефицита при моделировании травмы головного мозга крыс. Это влияние было более выражено чем у препаратов сравнения пикамилон, пирацетам, магния сульфат, кавинтон и мексидол.

5.5. Заключение.

Лечебное введение магния и лития оксибутиратов в дозах 150 и 200 мг/кг соответственно предотвращают нарастание тяжелых моторных асимметричных нарушений через 4 и 7 суток после моделирования травматического повреждения головного мозга. Под влиянием указанных соединений снижались нарушения локомоторной, ориентировочно-исследовательской активности и когнитивной функции у животных.

Магния оксибутират превосходил по церебропротекторной активности препараты позитивного контроля, такие как пирацетам, пикамилон, магния сульфат кавинтон и мексидол.

Глава 6. Церебропротекторный эффект курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на модели недостаточности половых гормонов с фокальной ишемией головного мозга у крыс.

Мы подтвердили наличие выраженной церебропротекторной активности исследуемых соединений на моделях ишемического и травматического повреждения головного мозга у крыс при однократном профилактическом введении. Однако необходимо оценить эту активность в условиях их лечебного курсового введения. Для этого была выбрана модель недостаточности половых гормонов у самок крыс, моделируемая путем овариоэктомии [167]. Снижение уровня половых гормонов, как было описано выше, приводит к совокупности патологических изменений в организме, связанных с нарушением функционирования сердечно-сосудистой системы, а также формированию нейродегенерации в тканях головного мозга у животных. Эта модель позволяет создать состояния близкие к клинической ситуации у пациенток, находящихся в менопаузе с высоким риском возникновения ОНМК. Для моделирования унилатерального ишемического повреждения нами была выбрана методика окклюзии среднемозговой артерии (ОСМА) у крыс [68; 215]. Эта модель позволяет воспроизвести унилатеральное повреждение головного мозга, характер которого отражает клиническую ситуацию.

6.1 Влияние лечебного курсового введения солей гамма-оксимасляной кислоты на неврологический статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомизированных крыс.

Оценка неврологического дефицита животных на данной модели осуществлялась с неврологической шкалы Combs и D'Alecy и шкале Garcia. Эта совокупность тестов позволяет комплексно подойти к оценке степени нарушений моторных функций у животных. Оценка показателей по неврологическим шкалам производилась через 1, 3 и 7 суток после моделирования ОСМА, в «тесте-лестница» до и на 7 сутки после моделирования ОСМА.

Моделирование ОСМА у животных приводило к формированию стойкого неврологического дефицита, который проявлялся в снижении баллов по шкале Combs и Garcia.

На рис 10А видно, что показатели по шкале Combs у всех животных имеют приблизительно одно значение от 2 до 4, при этом происходит перекрытие значений медиан в пределах межквартильного размаха в каждой группе. На рис 10Б и 10В показана сравнительная картина показателей через 3 и 7 суток после моделирования ОСМА на фоне недостаточности половых гормонов у животных. Наибольшие значения баллов имеет только группа животных, получавших магния оксидутират (5-6 - 3 суток; 6-7 - 7 суток после ОСМА), что говорит о способности этих животных выполнять моторные тесты с улучшением показателей к 7 суткам от момента моделирования. Более низкие значения медиан баллов были отмечены в группах животных, получавших натрия, лития оксидутираты, а также магния сульфат и кавинтон. Показатели медиан животных, получавших пираретам и пикамилон, были очень близки к значениям контрольной группы животных.

Моделирование ОСМА у крыс приводило к нарушению симметрии движений и осязания у данных животных, что отразилось на баллах по шкале Garcia. На рис. 11 представлена общая картина показателей статистики на всех этапах наблюдения. Показатели по шкале Garcia через сутки после ОСМА у всех животных имеют приблизительно одно значение от 1 до 4. Через 3 суток после моделирования ОСМА в группах животных, получавших магния, натрия и лития оксидутираты, отмечались более высокие показатели по шкале Garcia с интервалом значений от 11 до 13 баллов, что говорит об отсутствии выраженной ассиметрии конечностей. Баллы групп животных, получавших кавинтон и магния сульфат, находились в пределах от 10 до 11. Через 7 суток после моделирования ОСМА более высокие баллы фиксировались в группах животных, которым вводили магния и лития оксидутираты, которые составили от 14 до 16 баллов.

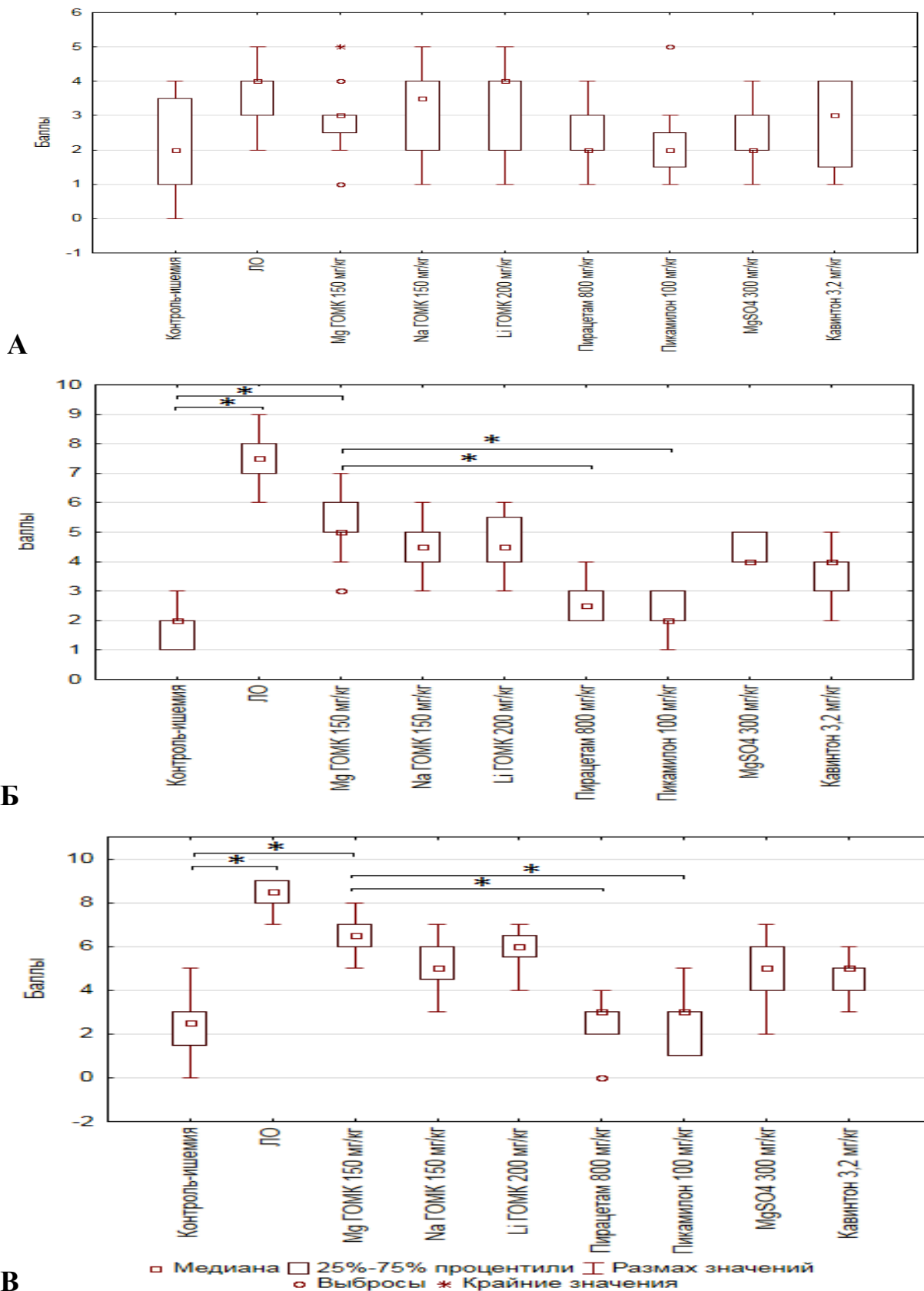


Рис. 10 Выраженность неврологического дефицита по шкале Combs у животных через 1 (А), 3 (Б) и 7 суток (В) после моделирования ОСМА на фоне курсового введения исследуемых соединений. Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксидутират, Na-ГОМК - натрия оксидутират, Li-ГОМК - лития оксидутират

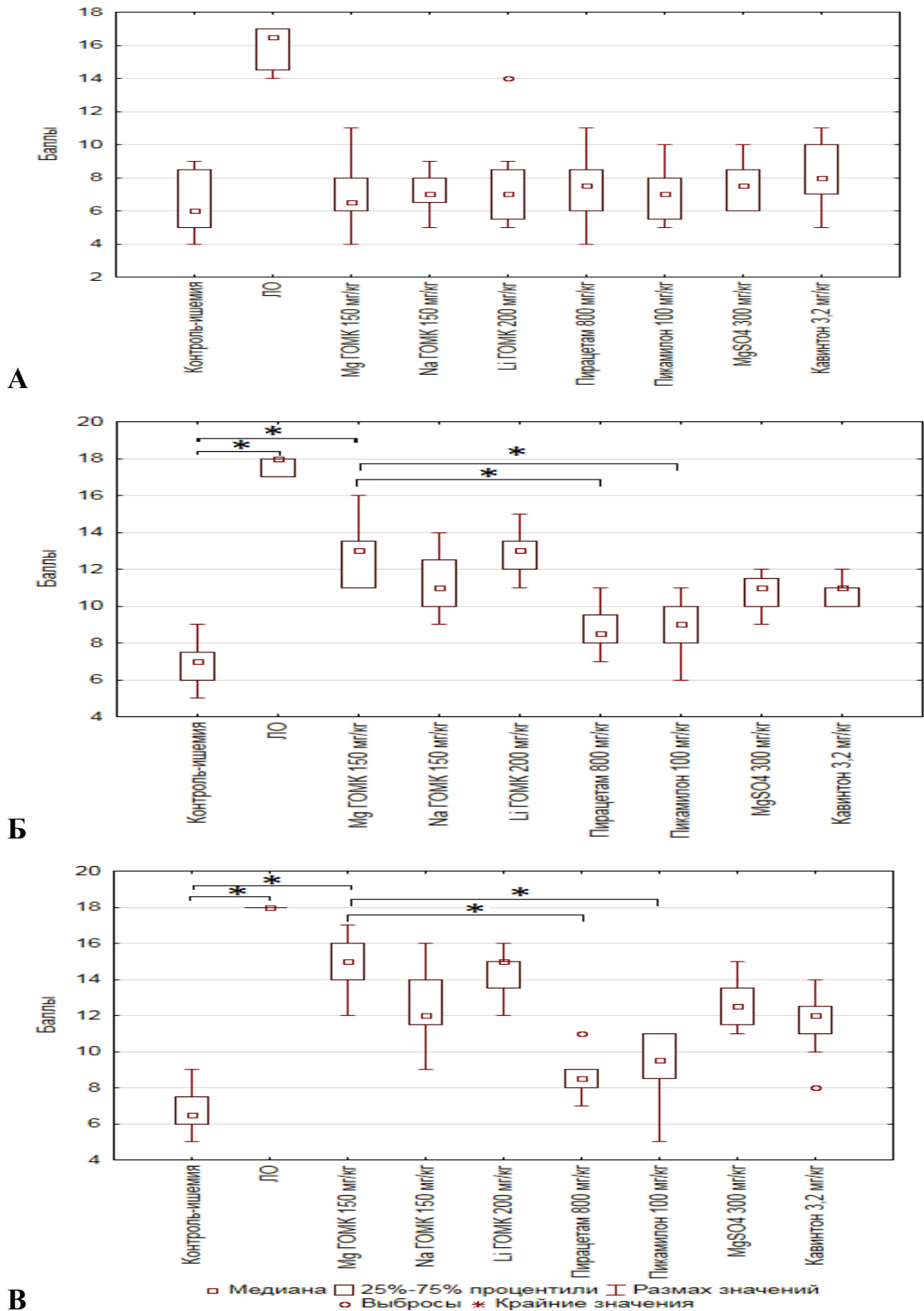


Рис. 11 Выраженность неврологического дефицита по шкале Garcia у животных через 1 (А), 3 (Б) и 7 суток (В) после моделирования ОСМА на фоне курсового введения исследуемых соединений. Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират

Диапазон значения у животных, получавших натрия оксибутират, магния сульфат и кавинтон, оказался меньше и составил от 11 до 14 баллов. Диапазон значений баллов животных, которым вводили пикамилон и пирацетам находился в пределах от 8 до 11 баллов.

Таким образом, наименее выраженные моторные нарушения отмечались у животных, получавших магния и лития оксибутираты, что говорит о более выраженном церебропротективном действии этих соединений при моделировании ОСМА на фоне недостаточности половых гормонов.

6.2 Влияние лечебного курсового введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит у животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомированных крыс.

6.2.1. Влияние лечебного курсового введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит у овариоэктомированных животных в тесте «Сужающаяся дорожка» или «Balance-beam test».

Тест «сужающаяся дорожка» или «Balance-beam test», как уже было сказано, являются одним из наиболее чувствительных и объективных методов оценки тяжести ассиметрических моторных нарушений у животных с унилатеральным повреждением головного мозга, которое формируется при моделировании ОСМА.

Через 3 и 7 суток после моделирования фокальной ишемии головного мозга в группе контрольных животных отмечалось статистически значимое повышение показателя ассиметрии относительно группы ложнооперированных животных. Так, на широком участке дорожки у оперированных контрольных животных был зафиксирован показатель ассиметрии равный $20,0 \pm 2,4$, на среднем - $54,8 \pm 3,7$, на узком - $68,3 \pm 3,6$ (Рис. 12).

Через 3 суток курсовое введение исследуемых соединений приводило к снижению процента ассиметрии на всех участках дорожки. Статистически значимое снижение показателя ассиметрии относительно показателей контрольной группы животных на всех участках дорожки было зафиксировано в

группах животных, получавших магния, натрия и лития оксибутираты при $p < 0,05$.

На этапе наблюдения *7 суток* было отмечено повышение показателя ассиметрии в оперированной контрольной группе животных, что составило (Рис. 5Б). Так, показатель в этой группе на широком участке дорожки составил $30,2 \pm 2,6$, на среднем - $60,3 \pm 3,0$, и на узком - $75,0 \pm 4,6$. Исследуемые соединения магния, натрия и лития оксибутираты снижали достоверно показатель ассиметричности у животных. Так магния оксибутират в дозе 150 мг/кг снижал показатель ассиметрии на широком участке до $12,9 \pm 1,6$, на среднем до $26,5 \pm 1,4$, на узком до $32,4 \pm 3,3$ при $p < 0,05$. Натрия оксибутират в дозе 150 мг/кг снижал показатель на широком участке до $10,9 \pm 1,9$, среднем - $28,5 \pm 1,4$, узком - $37,2 \pm 2,4$ при $p < 0,05$. Аналогичная тенденция к снижению наблюдалась в группе животных, которым вводили лития оксибутират в дозе 200 мг/кг - на широком участке до $11,1 \pm 1,5$, среднем - $22,5 \pm 2,1$, узком - $35,8 \pm 2,5$ при $p < 0,05$. В группе животных, получавших курсовое введение магния сульфата, было зафиксировано статистически значимое снижение показателя на среднем ($30,8 \pm 3,6$) и узком участках ($48,8 \pm 2,5$), а кавинтона только на узком участке дорожки и составляло $49,1 \pm 1,6$.

Таким образом, исследуемые соединения магния оксибутират в дозе 150 мг/кг, натрия оксибутират в дозе 150 мг/кг лития оксибутирата в дозе 200 мг/кг, а также магния сульфат оказывают превентивное действие в условиях курсового лечебного введения при моторно-ассиметрических нарушениях при моделировании фокальной ишемии головного мозга крыс на фоне овариоэктомии.

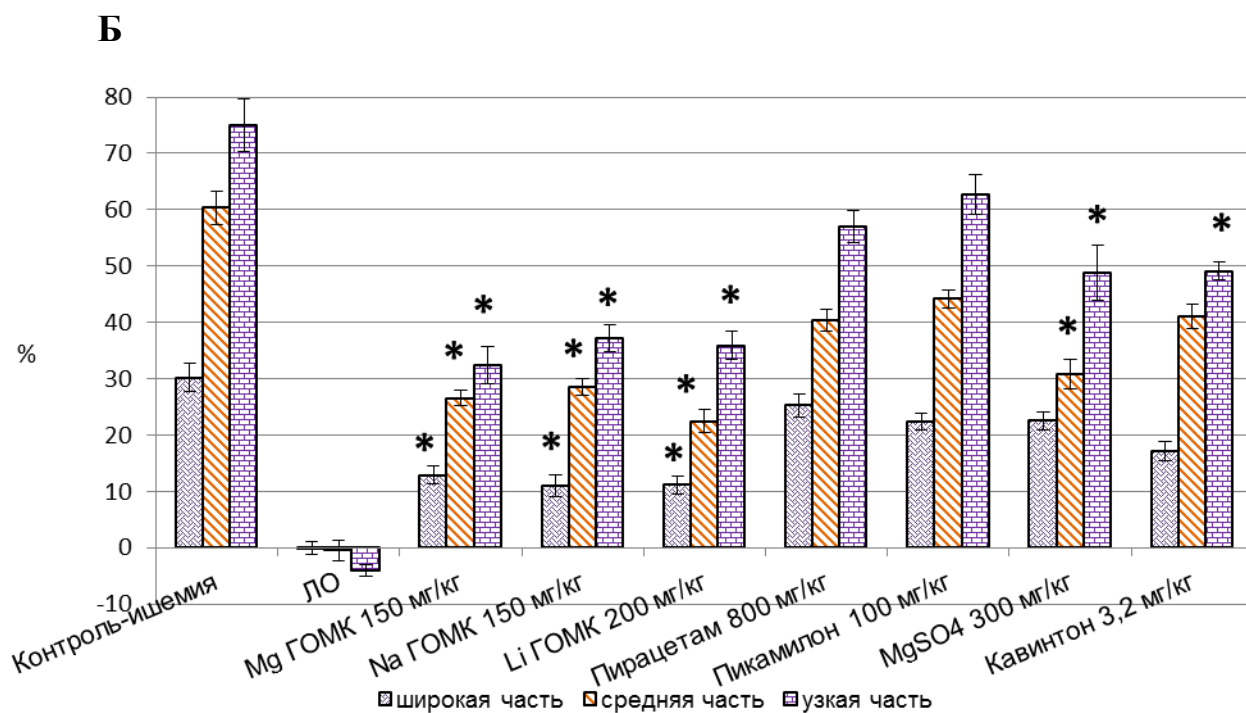
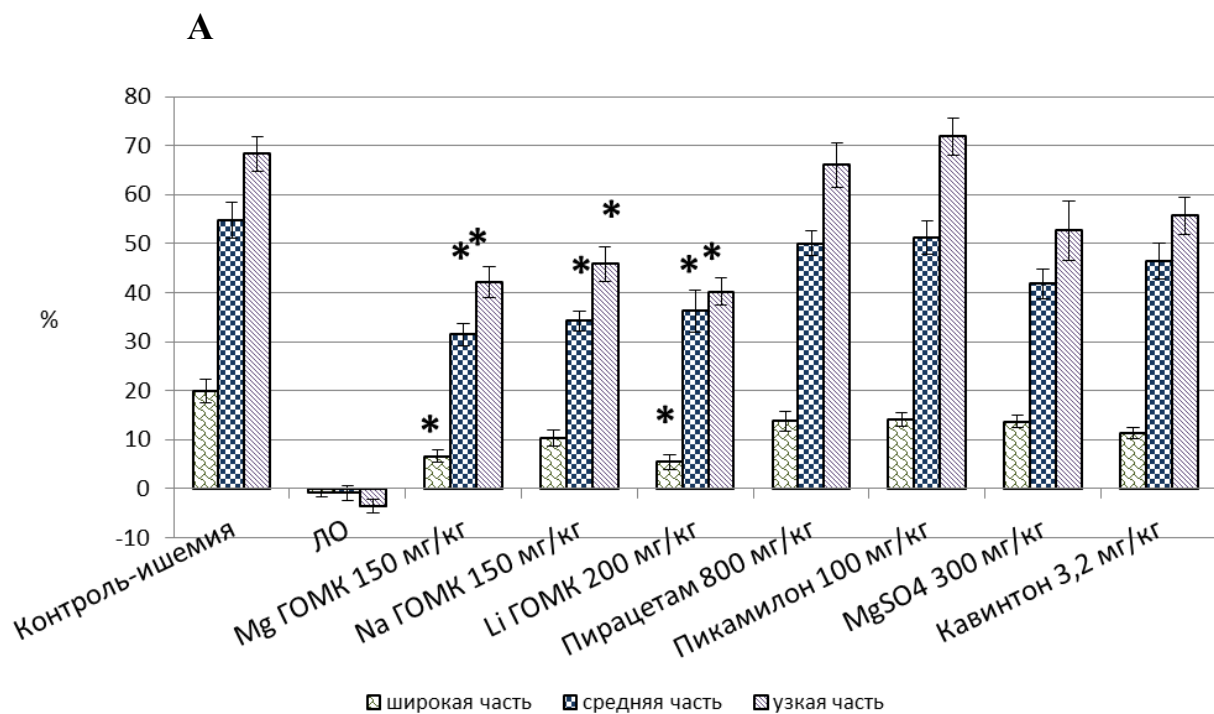


Рис. 12. Процент ассиметрии у животных в Balance-beam test на различных участках пути дорожки через 3 (А) и 7 суток (Б) после моделирования фокальной ишемии головного мозга на фоне овариоэктомии у крыс при лечебном курсовом введении исследуемых соединений, %.

Обозначения: ОЭ-животные с овариоэктомией, ЛО-ложнооперированные животные, ОСМА-животные с окклюзией средне-мозговой артерией, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой ОЭ+ОСМА животных; (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

6.2.2. Влияние курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на сенсомоторный дефицит на фоне недостаточности половых гормонов в тесте «Staircase test» (Montoya и др., 1991)

Как уже было указано, тестирование в «тесте лестница» («Staircase test») [182] позволяет достаточно точно оценить нарушение мелкой моторики конечностей у животных (Montoya, 1991). В этом тесте было оценено влияние курсового введения исследуемых соединений на сенсомоторный дефицит в результате создания фокальной ишемии головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов у животных.

На первом этапе тестирования был выявлен исходный уровень сенсомоторного статуса у животных, в среднем по каждой из групп количество собранных одной конечностью зерен составило от 7 до 9 [192].

Через 7 суток после моделирования ОСМА, у крыс развивались ассиметрические поражения моторной функции конечностей, что выражалось в резком снижении количества зерен, собранных животным как одной, так и другой конечностью. Так, например, количество собранных в группе животных оперированной контрольной группы составило $4,2 \pm 0,3$ для ипсилатеральной и $1,9 \pm 0,2$ для контрлатеральной конечностью. При этом эта разница между количеством зерен была статистически значима, что говорит о преимущественном моторном нарушении на противоположной стороне от нанесенного повреждения. Курсовое введение соединений магния, натрия, лития оксибутиратов приводило к статистически значимому повышению количества зерен, собранных как ипси- так и контрлатеральной стороне повреждения конечностями относительно животных контрольной группы при $p < 0,05$. (Таб. 16).

Таблица. 16

Количество зерен, собранных животными в тесте «Staircase-test» на нескольких этапах наблюдения после моделирования фокальной ишемии у овариоэктомированных крыс

| Группы | Исход | | 7 суток после ОСМА | |
|----------------------------|---------|---------|-----------------------|-----------------|
| | ИЛ | КЛ | ИЛ | КЛ |
| Интакт | 7,4±0,4 | 9,1±0,4 | 9,1±0,5* | 9,4±0,7* |
| ОЭ+ЛО | 7,9±0,5 | 8,7±0,7 | 7,2±0,3* | 6,4±0,3* |
| ОЭ+ОСМА | 7,5±0,4 | 8,3±0,2 | 4,2±0,3# | 1,9±0,2 |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 8,5±0,3 | 9,0±0,5 | 6,4±0,5* | 5,3±0,4* |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 8,6±0,3 | 8,7±0,7 | 6,2±0,4* | 4,2±0,3* |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 9,1±0,5 | 9,0±0,4 | 5,9±0,5* | 5,2±0,4* |
| Пирацетам 800 мг/кг | 9,1±0,7 | 7,8±0,6 | 4,0±0,3 | 1,8±0,2 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 7,8±0,3 | 8,9±0,7 | 4,1±0,3 | 2,0±0,2 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 7,6±0,3 | 9,2±0,5 | 4,2±0,2 | 2,2±0,2 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 8,1±0,2 | 8,0±0,2 | 5,2±0,2 | 2,2±0,4 |

Обозначения: ОЭ-животные с овариоэктомией, ЛО-ложнооперированные животные, ОСМА-животные с окклюзией средней мозговой артерией Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират; ИЛ - ипсилатеральная повреждению конечность; К- контрлатеральная повреждению конечность; * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса).

Таким образом, введение исследуемых соединений препятствует нарастанию сенсомоторного дефицита у животных на фоне недостаточности половых гормонов при моделировании фокальной ишемии головного мозга, что может говорить о наличии у них выраженного церебропротекторного эффекта, который превосходит препараты сравнения пикамилон, пирацетам, магния сульфат и кавинтон.

6.3. Влияние курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на поведенческий статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов.

В тесте ОП была проведена оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных с фокальной ишемией головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов. Так для оценки динамики нарушений поведенческого статуса, обучение в ОП проводили перед проведением овариоэктомии, далее воспроизведение осуществляли перед и через 7 суток после моделирования ОСМА.

Моделирование недостаточности половых гормонов путем овариоэктомии у самок-крыс приводило к снижению двигательной активности в тесте ОП, что выражалось в уменьшении количества пересеченных квадратов животными (Таб. 17). Так показатели двигательной активности группы оперированных контрольных животных составили на исходный момент $28,00 \pm 1,25$ и не отличались от показателей других групп. В то же время после проведения овариоэктомии этот показатель достоверно снижался в этой группе до $5,33 \pm 0,28$, что отражает тренд снижения во всех группах, кроме интактной, где он составил $19,91 \pm 2,49$, что достоверно относительно оперированной группы при $p < 0,05$.

Через 7 суток после моделирования ОСМА у овариоэктомизированных животных из группы контрольных оперированных было зафиксировано сохранение низкого показателя двигательной активности ($4,5 \pm 0,36$), что говорит о сохранении неврологического дефицита у этих животных.

Таблица. 17

Показатели двигательной активности животных с фокальной ишемией головного мозга в тесте «Открытое поле» на фоне курсового лечебного введения исследуемых соединений

| Группы | Обучение | 1 сутки до ОСМА | 7 суток после ОСМА |
|-------------------------|------------|---------------------|---------------------|
| Интакт | 25,58±1,22 | 19,91±2,49 * | 28,08±1,30 * |
| ОЭ+ЛО | 27,91±1,78 | 5,50±0,42 | 6,58±0,38 |
| ОЭ+ОСМА | 28,00±1,25 | 5,33±0,28 | 4,5±0,36 |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 34,83±1,13 | 7,75±0,25 | 11,41±0,72* |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 28,33±1,46 | 6,66±0,48 | 10,66±0,57* |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 27,33±1,36 | 7,91±0,26 | 10,25±0,78 * |
| Пирацетам 800 мг/кг | 26,83±1,31 | 7,00±0,43 | 5,33±0,65 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 27,58±1,21 | 7,58±0,41 | 5,66±0,76 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 29,00±1,33 | 8,00±0,37 | 7,25±0,68 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 29,33±1,56 | 7,66±0,58 | 10,16±0,67* |

Обозначения: ОЭ-животные с овариэктомией, ЛО-ложнооперированные животные, ОСМА-животные с окклюзией средне-мозговой артерией, Mg-ГОМК - магния оксидутират, Na-ГОМК - натрия оксидутират, Li-ГОМК - лития оксидутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой ОЭ+ОСМА животных; (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

Таблица. 18

Показатели ориентировочно-исследовательской активности животных с фокальной ишемией головного мозга в тесте «Открытое поле» на фоне курсового лечебного введения исследуемых соединений

| Группы | Исход | 1 сутки до ОСМА | 7 сутки после ОСМА |
|-------------------------|------------|---------------------|---------------------|
| Интакт | 13,83±0,68 | 14,08±0,62 * | 12,16±0,83 * |
| ОЭ+ЛО | 14,16±0,66 | 4,91±0,31 | 5,00±0,35 |
| ОЭ+ОСМА | 12,50±0,48 | 5,08±0,39 | 3,00±0,39 |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 13,16±0,66 | 5,83±0,40 | 9,91±0,81* |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 11,75±0,89 | 5,75±0,43 | 7,66±0,71* |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 14,83±0,62 | 7,25±0,30 | 10,00±0,53 * |
| Пирацетам 800 мг/кг | 13,75±0,75 | 6,08±0,45 | 5,58±0,45 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 15,66±0,65 | 6,00±0,37 | 7,33±0,59 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 14,83±0,40 | 6,41±0,43 | 4,66±0,43 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 14,41±0,57 | 6,75±0,58 | 9,66±1,01* |

Обозначения: ОЭ-животные с овариэктомией, ЛО-ложнооперированные животные, ОСМА-животные с окклюзией средне-мозговой артерией, Mg-ГОМК - магния оксидутират, Na-ГОМК - натрия оксидутират, Li-ГОМК - лития оксидутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой ОЭ+ОСМА животных; (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

Курсовое лечебное введение соединений магния, натрия, лития оксибутиратов, а также препарата позитивного контроля кавинтона приводило к повышению двигательной активности животных в ОП. Так показатель в группе животных, получавших магния оксибутират, составил $11,41 \pm 0,72$, натрия оксибутират - $10,66 \pm 0,57$, лития оксибутират - $10,25 \pm 0,78$ и кавинтон - $10,16 \pm 0,67$. Эти изменения носили статистически значимый характер при $p < 0,05$.

Показатель ориентировочно-исследовательской активности статистически значимо снижался у всех животных, после проведения им овариоэктомии (Таб. 18). Через неделю после моделирования ОСМА у животных контрольной группы наблюдался сниженный показатель. При этом было отмечено, что в группах животных получавших магния оксибутират ($9,91 \pm 0,81$), натрия оксибутирата ($7,66 \pm 0,71$), лития оксибутирата ($10,00 \pm 0,53$), а также препарат сравнения кавинтон ($9,66 \pm 1,01$), показатель ориентировочно-исследовательской активности статистически значимо превышал таковой в группе контрольных животных при $p < 0,05$.

Таким образом, вышеуказанные исследуемые соединения оказывают превентивное действие в формировании тяжелого поведенческого дефицита у крыс при моделировании фокальной ишемии на фоне недостаточности половых гормонов у крыс.

6.4 Влияние курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на мнестический статус животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов у крыс.

Оценка мнестического статуса животных проводилась в тестах УРПИ и ТЭИ до и через 7 дней после моделирования головного мозга ОСМА на фоне недостаточности половых гормонов.

При воспроизведении навыка пассивного избегания в тесте УРПИ на фоне фокальной ишемии головного мозга животных через 7 дней было выяв-

лено отсутствие памятного следа у животных оперированной контрольной группы, так как каждое животное совершило вход в темный отсек (Таб. 19). Введение исследуемых соединений магния, натрия и лития оксибутиратов приводило к снижению количества заходов относительно показателя контрольных животных при $p < 0,05$. Так в группе животных, получавших магния оксибутират только половина всех животных, совершила заход в отсек, а в группах животных, которым вводили натрия и лития оксибутираты - 66,6% и 58,3% соответственно. Таким образом, при воспроизведении навыка пассивного избегания в тесте УРПИ у вышеуказанных соединений было отмечено защитное действие в нарушении памятного следа.

Моделирование фокальной ишемии у крыс приводило к нарушению воспроизведения памятного следа о способе выполнения экстраполяционной задачи в ТЭИ. Так, животные контрольной группы через 7 дней после нанесения повреждения при воспроизведении навыка смогли решить задачу в среднем через $148,2 \pm 9,2$ секунд, что статистически значимо отличалось от показателей ложнооперированной группы животных ($28,2 \pm 1,6$) при $p < 0,05$ (Таб. 20). Показатели латентного периода подныривания животных, которым вводили исследуемые соединения составили для магния оксибутирата - $60,3 \pm 4,8$, натрия оксибутирата - $71,1 \pm 7,6$, лития оксибутирата - $69,1 \pm 5,5$, статистически значимо отличались от показателей оперированной контрольной группы при $p < 0,05$. животными через 7 дней после моделирования фокальной ишемии. Так, показатели этих групп составили $7,2 \pm 0,7$, $6,6 \pm 0,4$ и $6,8 \pm 0,6$ соответственно.

Таким образом, исследуемые соединения и в большей степени магния оксибутират в дозе 150мг/кг предотвращал тяжелые нарушение памяти при моделировании фокальной ишемии головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов. Указанный эффект статистически значимо превосходил пирацетам, пикамилон и магния сульфат.

Таблица. 19

Количество животных, зашедших в темный отсек в тесте УРПИ во время обучения и через 7 дней после моделирования ОСМА головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов при курсовом лечебном введении исследуемых соединений

| Группы | Обучение | | 7 дней | |
|-------------------------|----------|-----|-----------------|--------------|
| | N/n | % | N/n | % |
| Интакт | 12/ 12 | 100 | 0 / 12 | - |
| ОЭ+ЛО | 12/ 12 | 100 | 0 / 12 | - |
| ОЭ+ОСМА | 12 / 12 | 100 | 12 / 12 # | 100 |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 6 / 12* | 50* |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 8 / 12* | 66,6* |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 7 / 12 * | 58,3* |
| Пирацетам 800 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 11 / 12 | 91,6 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 11 / 12 | 91,6 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 12 / 12 | 100 | 12 / 12 | 100 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 12 / 12 | 100 | 10 / 12 | 83,3 |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, N-число животных, зашедших в темный отсек; n – число животных в группе; ОЭ-животные с овариэктомией, ЛО-ложнооперированные животные, ОСМА-животные с окклюзией средне-мозговой артерией * - достоверно по отношению к ОЭ+ОСМА группе животных при $p < 0,05$, # - достоверно по отношению к ОЭ+ЛО группе животных при $p < 0,05$

Таблица 20

Латентный период подныривания животных в тесте ТЭИ во время обучения и через 7 дней после моделирования ОСМА головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов при курсовом лечебном введении исследуемых соединений

| Группы | 1 сутки до ОСМА | 7 сутки после ОСМА |
|-------------------------|-----------------|--------------------|
| Интакт | 67,5±5,9 | 28,2±1,6 * |
| ОЭ+ЛО | 53,3±3,8 | 47,9±3,4 |
| ОЭ+ОСМА | 49,8±3,7 | 148,2±9,2 |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 63,1±6,1 | 60,3±4,8* |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 71,2±6,5 | 71,1±7,6* |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 78,3±4,4 | 69,1±5,5 * |
| Пирацетам 800 мг/кг | 65,2±6,2 | 99,4±12,2 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 61,3±5,6 | 109,4±11,9 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 68,1±5,8 | 107,8±14,1 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 67,9±9,7 | 90,0±7,9 |

Обозначения: ОЭ-животные с овариэктомией, ЛО-ложнооперированные животные, ОСМА-животные с окклюзией средне-мозговой артерией, Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой ОЭ+ОСМА животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

6.5 Влияние курсового лечебного введения солей гамма-оксимасляной кислоты на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании фокальной ишемии головного мозга на фоне недостаточности половых гормонов.

Было проведено исследование по изучению вазодилатирующей функции эндотелия в условиях модификации синтеза эндогенного NO, воспроизводимого при внутривенном болюсном введении ацетилхолина, L-аргинина, нитро-L-аргинина на фоне недостаточности половых гормонов после моделирования фокальной ишемии головного мозга. Эндотелий независимая вазодилатация, для установления факта сохранности адекватного функционирования гладкой мускулатуры сосудов, была оценена с помощью введения нитроглицерина [70].

В ходе исследования было установлено, что у животных как в группе ишемизированных, так и ложнооперированных с овариоэктомией отмечалось статистически менее значимая реакция на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина, и статистически более значимая при введении L-аргинина, чем у интактных животных, тогда как реакция на нитроглицерин во всех экспериментальных группах практически не отличается друг от друга (Рис. 13).

В исследуемых группах, животные, которые получали курсовое введение соединений магния, натрия и лития оксибутираты, отмечалась статистически значимая более выраженная сосудистая реакция, в ответ на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина и меньшая реакция в ответ на введение L-аргинина, чем у животных контрольной группы (Рис. 13). Эти данные могут свидетельствовать о сохранности функциональной активности эндотелия сосудов у животных после моделирования ОСМА при курсовом введении оксибутиратов магния, натрия и лития. Эти соединения оказывают церебропротективное и эндотелиопозитивное действие, превосходящее таковое у препаратов сравнения пирацетам, пикамилон, магния сульфат и кавинтон.

6.6 Заключение.

В данной серии экспериментов мы проанализировали влияние курсового лечебного введения исследуемых соединений на показатели неврологического, моторного, когнитивного, поведенческого дефицита, а также оценили эндотелиальную дисфункцию у животных на фоне недостаточности половых гормонов с ОСМА. Моделирование овариоэктомии приводило к снижению двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в нескольких тестах, при этом, не затрагивая мнестическую и моторную функцию у животных. В свою очередь, моделирование ОСМА у таких животных приводило к формированию стойких неврологических поведенческого и мнестического дефицита, усиливая его после овариоэктомии. Результаты показали, что курсовое лечебное введение исследуемых соединений, таких как магния и лития оксибутирата уменьшает выраженность моторного ассиметрическо-

го, поведенческого и когнитивного дефицита, снижает эндотелиальную дис- функцию.

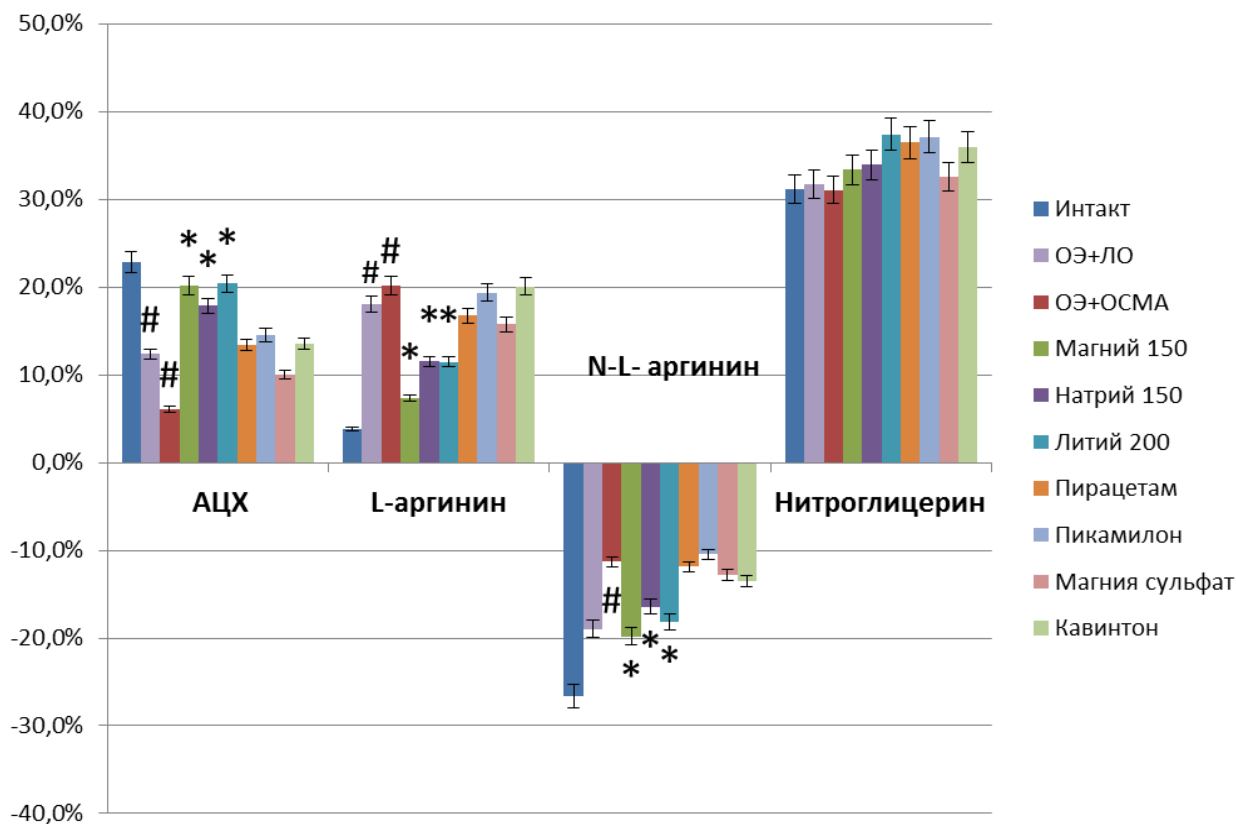


Рис. 13. Изменение уровня мозгового кровотока при введении модификаторов синтеза оксида азота животным с отеком головного мозга после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения.

Обозначения: ОЭ-животные с овариоэктомией, ЛО-ложнооперированные животные, ОСМА-животные с окклюзией средне-мозговой артерией; Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; # - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с группой интактных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

Однако введение натрия оксибутирата приводило к меньшему снижению неврологического дефицита, а введение препарата сравнения кавинтон только приводило к снижению выраженности поведенческого дефицита.

Таким образом, магния оксибутират проявил выраженно церебропротективное действие у животных в условиях фокальной ишемии на фоне недостаточности половых гормонов, которое превосходило препараты сравнения пикамилон, пирацетам, магния сульфат и кавинтон.

Глава 7. Изучение вероятных механизмов действия солей гамма-оксимасляной кислоты на различных моделях гипоксического, ишемического и травматического повреждения головного мозга у крыс.

Далее нам представлялось интересным выяснить возможные основные звенья патогенеза, на которые, так или иначе, оказывают влияние исследуемые соединения.

7.1 Изучение противогипоксического действия солей гамма-оксимасляной кислоты на моделях нормобарической и гемической гипоксии.

Практически все виды нарушений мозгового кровообращения связаны с наличием выраженного состояния гипоксии головного мозга и индуцированных ею процессов, которые в свою очередь оказывают негативное влияние на течение ишемического процесса [6]. В связи с этим нам представлялось актуальным изучить наличие и выраженность противогипоксической активности солей гамма-оксимасляной кислоты как компонент церебропротекторного механизма указанных соединений.

В ходе эксперимента было установлено, что время наступления апноэ у животных контрольной группы, получавшей физиологический раствор, составило $1423,2 \pm 25,9$ секунды (Таб. 21). Введение солей ГОМК во всех исследуемых дозах приводило к статистически значимому увеличению времени до появления апноэ при $p < 0,05$. Самый высокий показатель был отмечен в группе животных, получавших магния оксибутират в дозе 150 мг/кг, при этом время до наступления апноэ в этой группе в среднем увеличивалось на 50%. Статистически значимое увеличение времени отмечалось в группе животных, получавших мексидол.

Таблица 21

Время до наступления апноэ и смерти у животных на моделях нормобарической и гемической гипоксии соответственно на фоне профилактического введения исследуемых соединений, секунды

| Группы | | Время до наступления апноэ | Δ% относительно контрольной группы | Время до наступления смерти | Δ% относительно контрольной группы |
|-------------------------|-----------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Контроль-гипоксия | | 1423,2±25,9 | - | 782,1±44,1 | - |
| Mg-ГОМК | 100 мг/кг | 1770,7±66,7* | 24% * | 951,2±30,1* | 22%* |
| | 150 мг/кг | 2154,2±111,3* & | 51%*^ | 1027,2±17,1* | 31%* & |
| | 200 мг/кг | 1803,8±35,5* | 27% * | 969,8±27,2* | 24%* |
| Na-ГОМК | 100 мг/кг | 1970,4±71,8* | 38% * | 1006,6±18,4* | 29%* |
| | 150 мг/кг | 1855,6±31,9* | 30%* | 987,8±20,4* | 26%* |
| | 200 мг/кг | 1863,6±25,3* | 31%* | 1001,1±16,9* | 28%* |
| Li-ГОМК | 100 мг/кг | 1876,6±50,9* | 32%* | 971,7±36,4* | 24%* |
| | 150 мг/кг | 1924,0±46,9* | 35%* | 1032,5±47,1* | 28%* |
| | 200 мг/кг | 1981,2±43,7 * | 39% * | 1075,0±39,5 * | 37%* & |
| Пирацетам 800 мг/кг | | 1547,4±41,4 | 9% | 886,3±35,0 | 13% |
| Пикамилон 100 мг/кг | | 1662,1±65,17 | 17% | 918,5±27,2 | 17% |
| Магния сульфат 300мг/кг | | 1719,8±64,7 | 21% | 940,6±28,5 | 20% |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | | 1578,8±40,3 | 11% | 794,1±44,0 | 1% |
| Мексидол 20мг/кг | | 1859,2±48,4 * | 22%* | 1036,3±31,3* | 32%* |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; & - различия достоверны по сравнению к группе животных, получавших магния сульфат (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна)

Для подтверждения наличия выраженной противогипоксической активности у солей гамма-оксимасляной кислоты мы использовали тест с другим механизмом развития гипоксии – гемической, инициированной введением нитрита натрия в токсической дозе 250 мг/кг [14]. Эта модель приводит к достаточно быстрой гибели животного на фоне нитритной интоксикации. Так показатель времени до смерти животных контрольной группы составил $782,1 \pm 44,1$ секунды. Введение животным солей ГОМК во всех исследуемых дозах приводило к увеличению времени до наступления смерти животных, что было статистически значимо по отношению к контрольной группе животных при $p < 0,05$. Также статистически значимое повышение времени было отмечено в группах животных, получавших мексидол.

Таким образом, результаты эксперимента доказывают наличие у исследуемых соединений выраженного антигипоксического эффекта на моделях нормобарической и гемической гипоксии. Наиболее этот эффект выражен у соединений магния оксибутират в дозе 150 мг/кг, статистически значимо превосходившие пирацетам, пикамилон, кавинтон и магния сульфат.

7.2 Влияние профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты на показатели локального мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании ишемического и травматического повреждения головного мозга у крыс.

7.2.1 Влияние введения солей гамма-оксимасляной кислоты на показатели локального мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов при моделировании ОСА.

Степень и продолжительность снижения локального мозгового кровотока у животных напрямую коррелирует с тяжестью ишемического поражения структур мозговой ткани. Количественная оценка уровня перфузии мозговой ткани кровью носит важный прогностический характер и даёт возможность определять дальнейшие терапевтические стратегии. Регистрация более плавного снижения интенсивности мозгового кровотока может указывать на более быструю активацию или развитие коллатеральной сети в мозговой ткани, при этом оценка вазодилатирующей функции эндотелия позволяет судить о выраженности его дисфункции и способности поддерживать кровоток в относительно нормальных величинах, близких к физиологическим [3; 97; 225; 138;].

Литературные данные свидетельствуют о том, что эндотелий церебральных сосудов активно участвует в развитии цереброваскулярной патологии [12], поскольку принимает ключевую роль в модуляции сосудистого тонуса, за счет продукции вазоактивных веществ, наиболее важным из которых является оксид азота. Эндотелиальная дисфункция при этом проявляется, в том числе и нарушением эндотелиозависимой вазодилатации, которую в условиях эксперимента, возможно, оценить по степени изменения показателей мозгового кровотока при введении модификаторов синтеза эндогенного оксида азота.

Была проведена оценка уровня локального мозгового кровотока и вазодилатирующей функции эндотелия у животных, подвергшихся ОСА, гравитационной ишемии и травматическому повреждению головного мозга.

Исследование уровня локального мозгового кровотока в бассейне средней мозговой артерии крыс, подвергшихся ОСА, проводилось через 72 часа после создания ишемии головного мозга.

Уровень локального мозгового кровотока контрольной группы животных в момент регистрации был статистически значимо ниже ($2,7 \pm 0,1$), чем в группе ложнооперированных животных ($4,9 \pm 0,1$) (Рис. 14). Вазодилатирующий ответ эндотелия на введение ацетилхолина в группе ложнооперированных животных выражался достоверным увеличением скорости мозгового кровотока, по отношению к исходным значениям, в среднем на $26\% \pm 4\%$, в то время как увеличение кровотока в группе контрольных животных с ишемией мозга было незначительно и составляло $6\% \pm 2\%$ (Рис. 15)

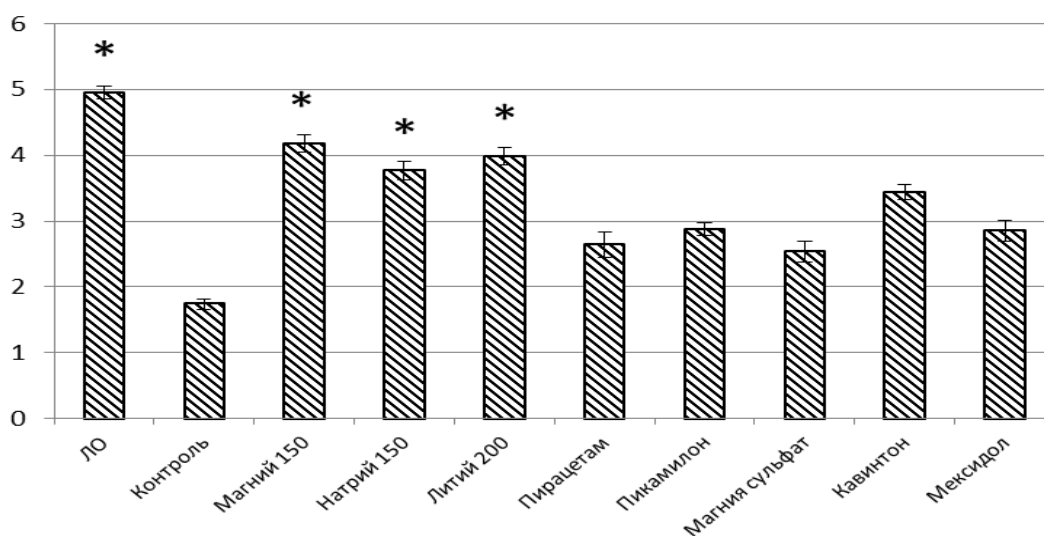


Рис. 14. Исходный уровень локального мозгового кровотока животных после моделирования ОСА головного мозга, усл.ед.

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

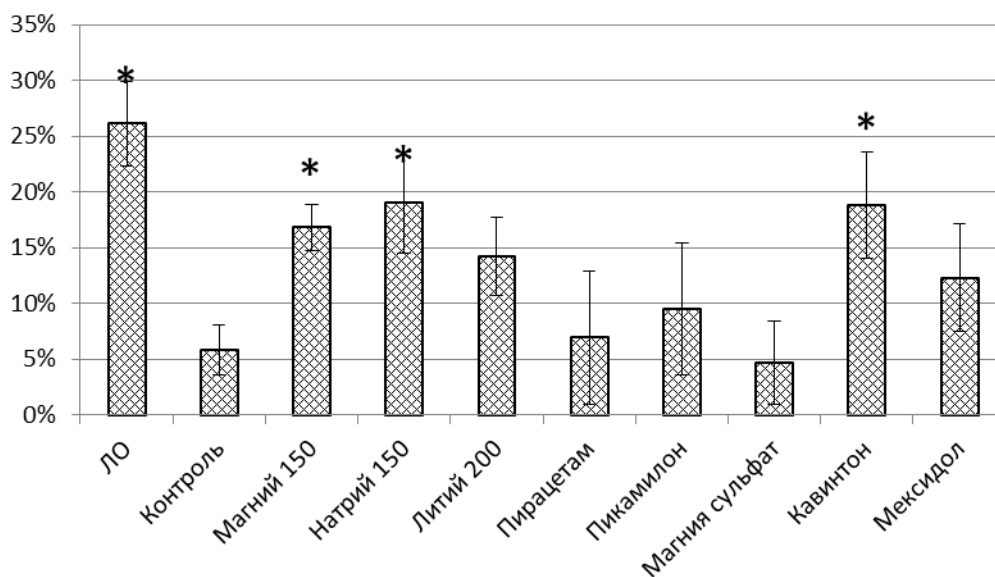


Рис.15. Выраженность прироста локального мозгового кровотока животных после моделирования ОСА головного мозга в ответ на введение ацетилхолина, %

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

В группах животных, получавших исследуемые соединения магния оксibuтират ($4,2 \pm 0,1$), натрия оксibuтират ($3,7 \pm 0,1$), лития оксibuтирата ($3,9 \pm 0,1$) интенсивность локального мозгового кровотока была значительно выше относительно наблюдаемого в группах негативного контроля. Введение животным до операции препаратов позитивного контроля не приводило к сохранению или восстановлению параметров мозговой перфузии через 72 часа после моделирования ишемии.

Статистически значимое увеличение мозгового кровотока в ответ на введение ацетилхолина фиксировалось у животных, получавших магния оксibuтират ($17\% \pm 2\%$), натрия оксibuтират ($19\% \pm 5\%$), и в группе животных, получавших кавинтон ($19\% \pm 5\%$) (Рис. 11).

Для оценки эндотелийнезависимой вазодилатации аналогичным образом вводился нитроглицерин. Сосудистый ответ, выражающийся в увеличении интенсивности кровотока, статистически значимо не отличался во всех исследуемых группах (Рис. 16).

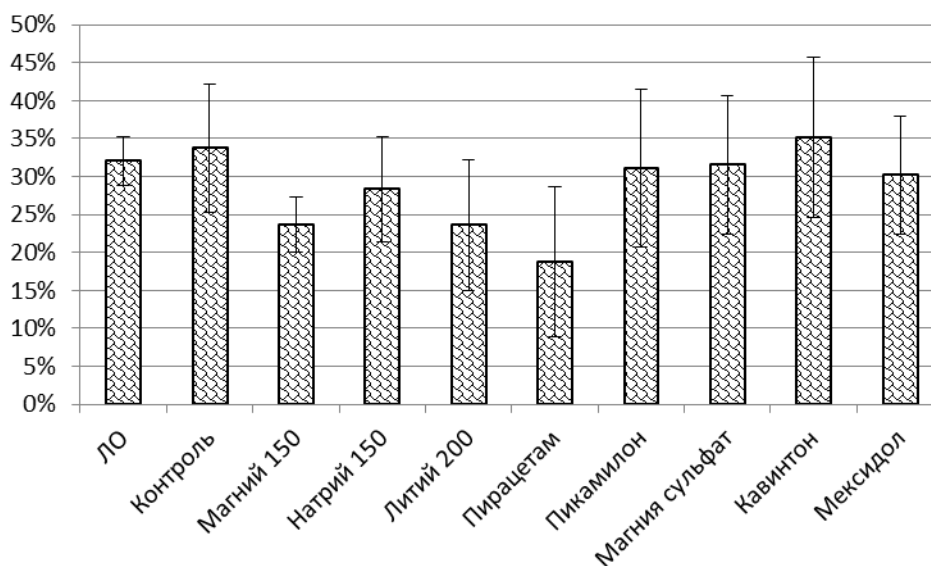


Рис. 16 Выраженность прироста локального мозгового кровотока животных после моделирования ОСА головного мозга в ответ на введение нитроглицерина, %

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

7.2.2 Влияние профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты на показатели локального мозгового кровотока и вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании гравитационной ишемии головного мозга у крыс.

Гравитационные перегрузки в кранио-каудальном направлении вызывают стойкое нарушение мозгового кровотока, характер и тяжесть которого зависит от силы и продолжительности воздействия [19]. При воспроизведении модели отмечается развитие трех стадий изменения мозгового кровотока: резкое снижение до нулевого уровня, резкое увеличение в период гипер- и сменяющий его гипоперфузии. При этом возникающие изменения кровотока, в основном, компенсируются активным функционированием эндотелиальных клеток, а точнее системой NO, как основного вазодилатирующего фактора [95; 48; 70].

Мозговой кровотоком, регистрируемый в проекции средней мозговой артерии, у интактных животных составил $4,7 \pm 0,11$ усл.ед, и превышал таковой

показатель у животных контрольной группы, подвергшихся гравитации, уровень кровотока которых составил $3,1 \pm 0,2$ усл. ед. (Рис . 17).

Уровень мозгового кровотока животных, которые профилактически получали соединения магния, натрия и лития оксибутираты был статистически значимо выше регистрируемого у контрольной группы и составил $4,2 \pm 0,12$, $4,4 \pm 0,13$ и $4,2 \pm 0,15$ соответственно ($p < 0,05$).

Введение ацетилхолина интактным крысам приводило к достоверному увеличению, соответственно на 28%, скорости кровотока относительно фоновых значений. Введение ацетилхолина животным контрольной группы приводило к статистически значимому менее выраженному, чем у интактных животных, приросту мозгового кровотока составлявшему 9% (Рис. 18) относительно фоновых значений, что может свидетельствовать о снижении эндотелиозависимой вазодилатации (ЭЗВД) вследствие уменьшения продукции и высвобождения NO.

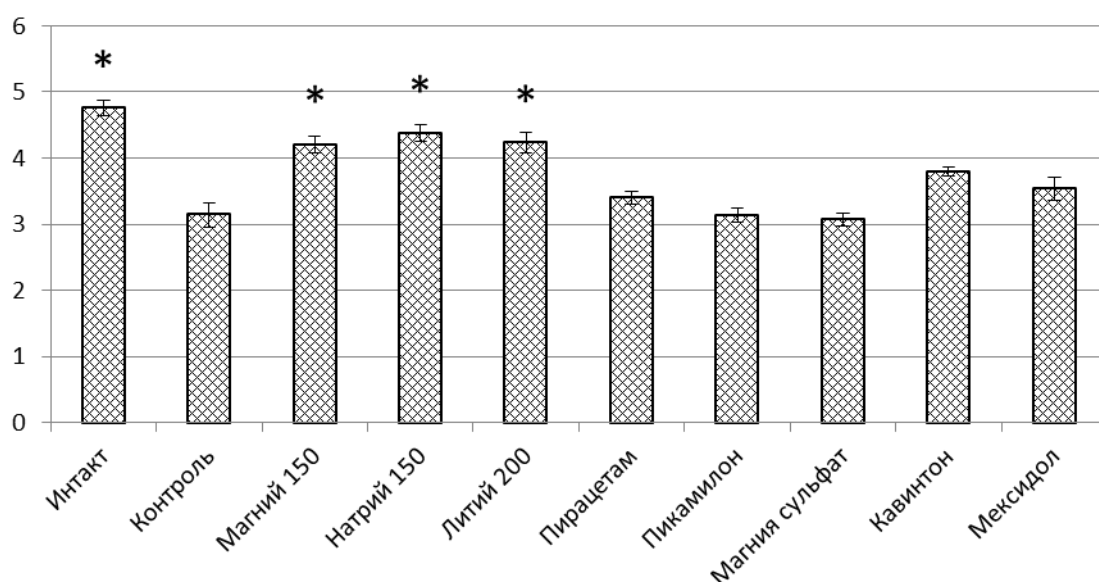


Рис. 17. Исходный уровень локального мозгового кровотока после моделирования гравитационной ишемии головного мозга после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения, усл.ед.

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

Введение индуктора эндотелийзависимой вазодилатации вызывало прирост кровотока на $21\% \pm 4\%$, в условиях превентивного введения животным соединения магния оксибутирата (Рис. 18). Прирост регистрируемых показателей мозгового кровотока у животных получавших соединение лития оксибутират в условиях введения ацетилхолина достоверно превосходил аналогичные в группе контроль-ишемия и составил $15\% \pm 5\%$.

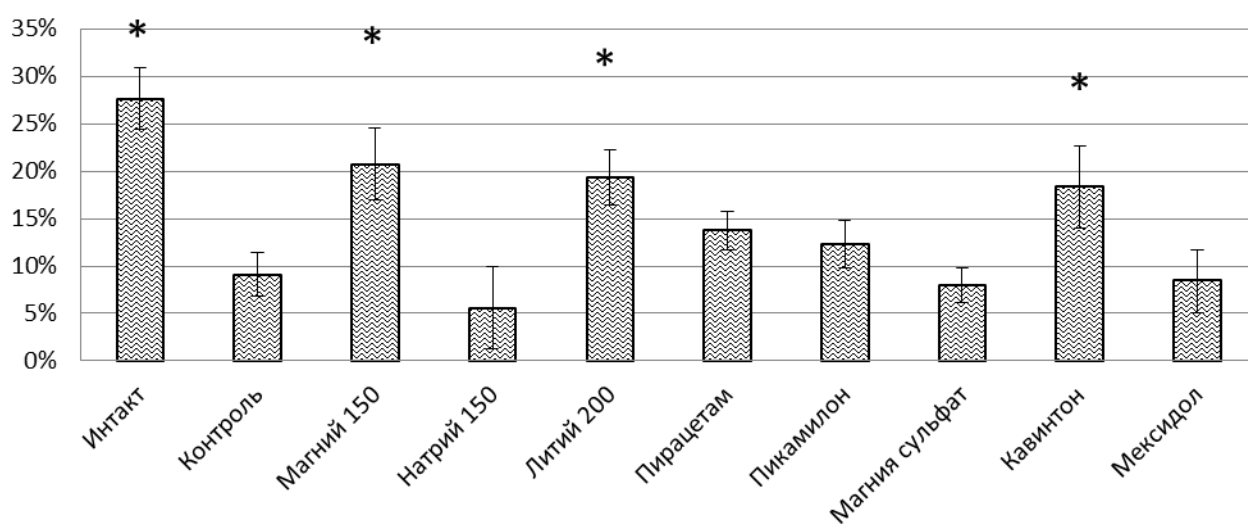


Рис. 18. Выраженность прироста локального мозгового кровотока животных после моделирования гравитационной ишемии головного мозга в ответ на введение ацетилхолина, %

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

Введение животным всех экспериментальных групп индуктора эндотелийнезависимой вазодилатации нитроглицерина приводило к сопоставимому приросту кровотока (Рис. 19), что свидетельствует о полном сохранении функциональной активности гладкомышечных сосудистых клеток.

Таким образом, в результате ишемического повреждения возникает дисфункция эндотелия, выражающаяся в снижении сосудистого ответа на стимулирование эндотелиозависимой вазодилатации, в то время как функция сосудистых миоцитов в полной мере отвечает физиологической норме. При

этом введение магния, натрия и лития оксибутиратов приводит к сохранению функциональной активности эндотелия.

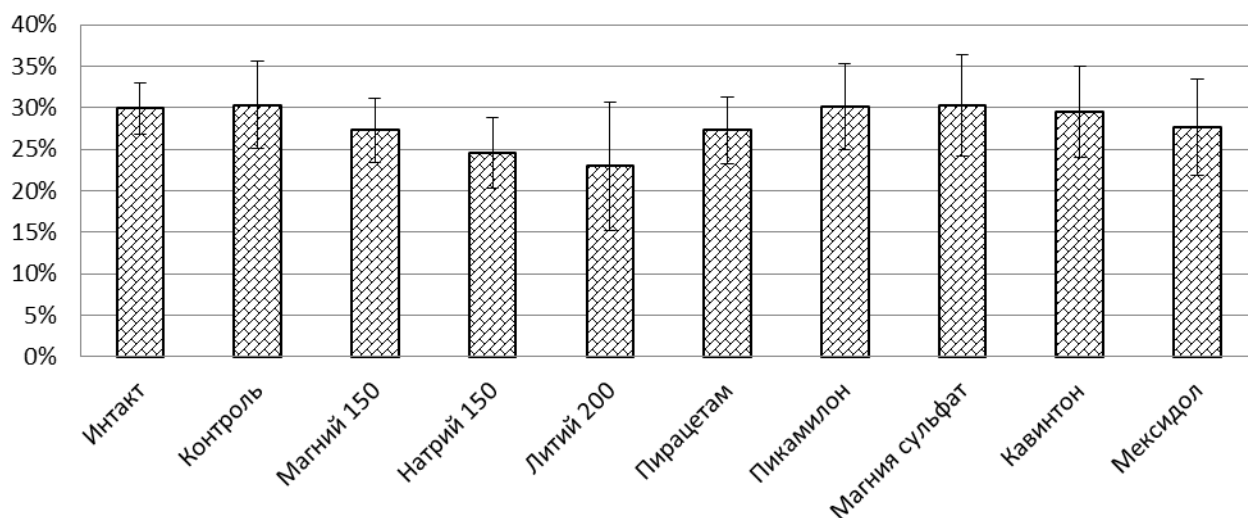


Рис. 19. Выраженность прироста локального мозгового кровотока животных после моделирования гравитационной ишемии головного мозга в ответ на введение нитроглицерина, %

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

7.2.3 Влияние профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга у животных при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс.

У животных, подвергшихся моделированию травматического повреждения мозга обнаруживается статистически менее значимая реакция на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина, и статистически более значимая при введении L-аргинина, чем у ложнооперированных животных, тогда как реакция на нитроглицерин во всех экспериментальных группах практически не отличается друг от друга (Рис. 20).

В исследуемых группах, животные, которые получали соединения магния, натрия и лития оксибутираты, отмечалась статистически значимо более выраженная сосудистая реакция, в ответ на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина и значительно меньшая реакция в ответ на введение L-аргинина,

чем у животных контрольной группы (Рис. 20). Эти данные могут свидетельствовать о том, что соединения магния, натрия и лития оксibuтираты оказывают церебропротективное и эндотелиопозитивное действие, сопоставимое или несколько превосходящее таковое у препарата сравнения кавинтон.

7.3. Влияние профилактического введения солей гамма-оксимасляной кислоты на биохимические показатели крыс при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс.

Наличие в патогенезе ишемического повреждения головного мозга тесной взаимосвязи нарушений энергетического и пластического обмена оказывает существенное влияние на течение и прогноз заболевания, которое необходимо учитывать при поиске средств с церебропротективной активностью. Многие ученые считают, что метаболическая терапия, осуществляемая как в острый период инсульта, так и в восстановительный, является мощным превентивным фактором по отношению к повторным инсультам, инвалидизации больных и их гибели. В связи с этим следующим этапом исследований явилось сравнительное изучение эффективности коррекции исследуемыми солями гамма-оксимасляной кислоты метаболических нарушений у крыс с ишемией головного мозга.

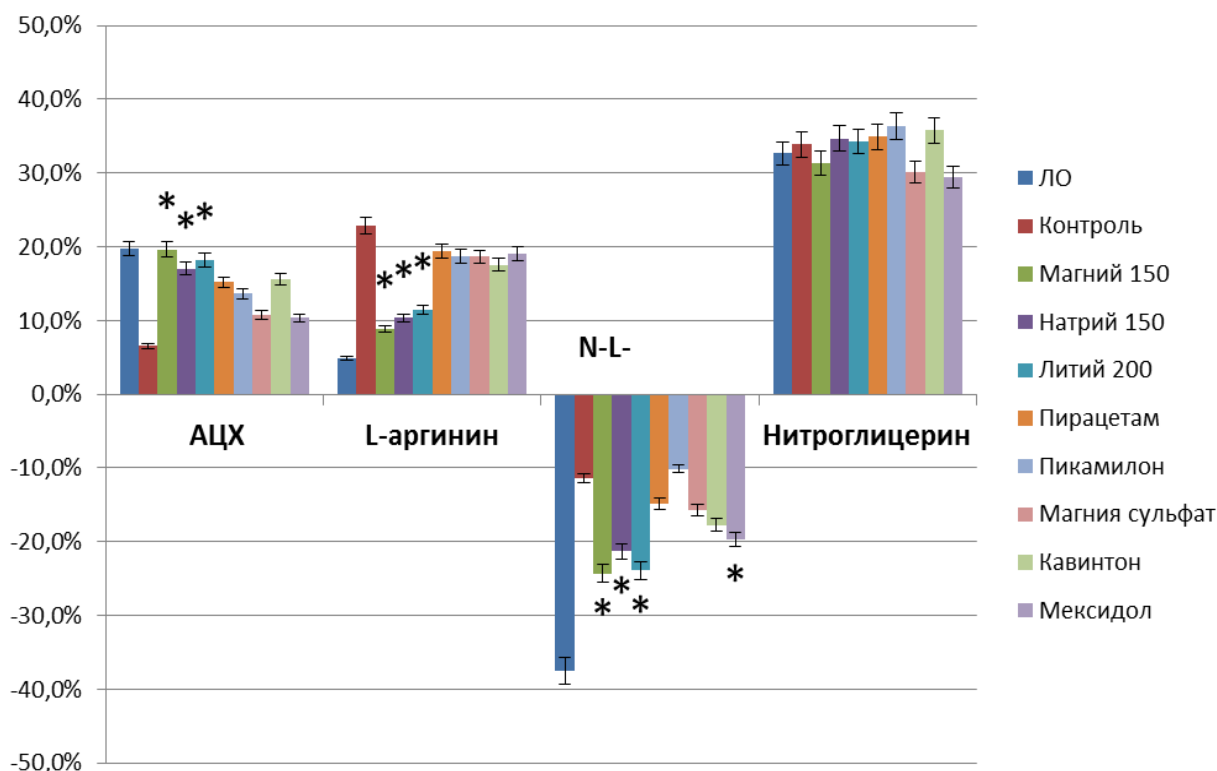


Рис. 20. Изменение уровня мозгового кровотока при введении модификаторов синтеза оксида азота животным с травмой головного мозга после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения.

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных; (ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий, Данна).

7.3.1. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на выраженность процессов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в условиях травматического повреждения головного мозга.

Травматическое поражение головного мозга сопровождается состоянием «окислительного» стресса, проявляющееся в гиперпродукции активных форм кислорода, что в этих условиях усугубляется нарастанием нарушений метаболизма глюкозы, возникновением ацидоза, сопровождающегося повреждением клеточных мембран и гибелью клеток. Повреждение может носить обратимый характер на ранней стадии ишемии, что подчеркивает необходимость ранних терапевтических вмешательств и комплексных исследований

биохимических процессов. Таким образом, оксидантный стресс выступает в роли ведущего фактора повреждения мозга при ишемии [62]. Поэтому нам представлялось важным оценить интенсивность свободнорадикального окисления, и состояние антиоксидантной системы у животных на фоне травмы головного мозга. Были определены концентрация ТБК-активных продуктов, активность ферментов антиоксидантной системы – СОД и каталазы в условиях травматического повреждения мозга.

Было установлено, что после моделирования травмы головного мозга происходит значительная интенсификация процессов свободнорадикального окисления, что выражалось в накоплении и увеличении концентрации ТБК-активных продуктов в плазме крови контрольных животных на фоне снижения активности ключевых ферментов антиоксидантной системы (каталазы и СОД).

Так в контрольной группе концентрация ТБК-активных продуктов составила $5,0 \pm 0,4$ и была на 75,6% статистически значимо выше чем таковая в группе ложнопериорированных животных ($2,9 \pm 0,3$), при этом активность каталазы и СОД в плазме крови контрольной группы животных составили $248,4 \pm 36,6$ и $28,8 \pm 3,3$, что было также статистически значимо ниже чем показатели ложнопериорированной группы на 45% и 47%, соответственно (при $p < 0,05$) (Рис. 21, Рис. 22, Рис. 23).

В группах животных, получавшие исследуемые соединения магния, натрия и лития оксибутираты в соответствующих дозах и мексидол концентрация ТБК-активных продуктов была статистически значимо ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе (Рис. 21). При этом введение указанных соединений на фоне отека головного мозга, статистически значимо повышало активность каталазы и СОД в плазме крови по сравнению с контрольной группой (Рис. 22, Рис.23).

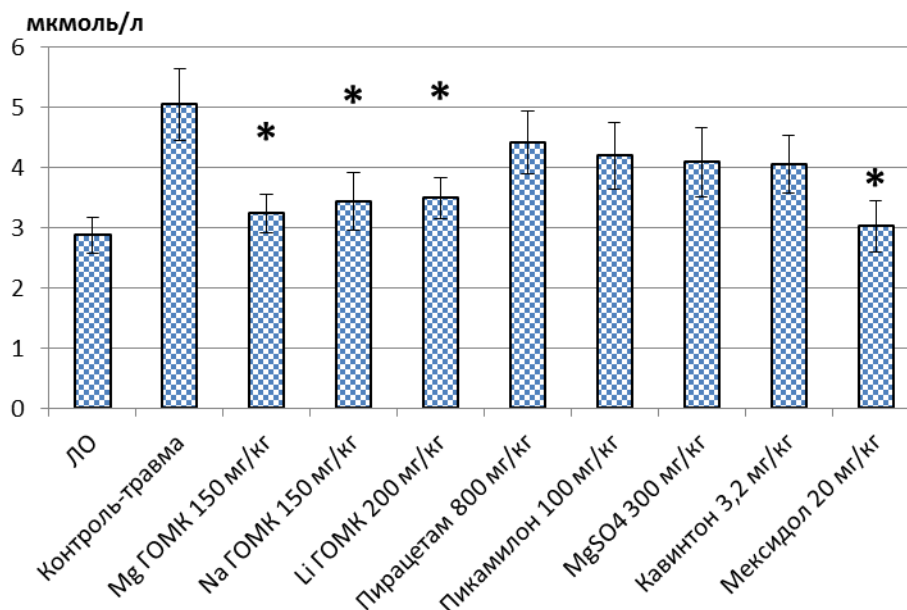


Рис.21. Концентрации ТБК-активных продуктов в плазме крови животных после моделирования травмы головного мозга и введения исследуемых соединений и препаратов сравнения, мкмоль/л

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-GOMK - магния оксibuтират, Na-GOMK - натрия оксibuтират, Li-GOMK - лития оксibuтират, *- различия статистически достоверны по q-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных при $p < 0,05$

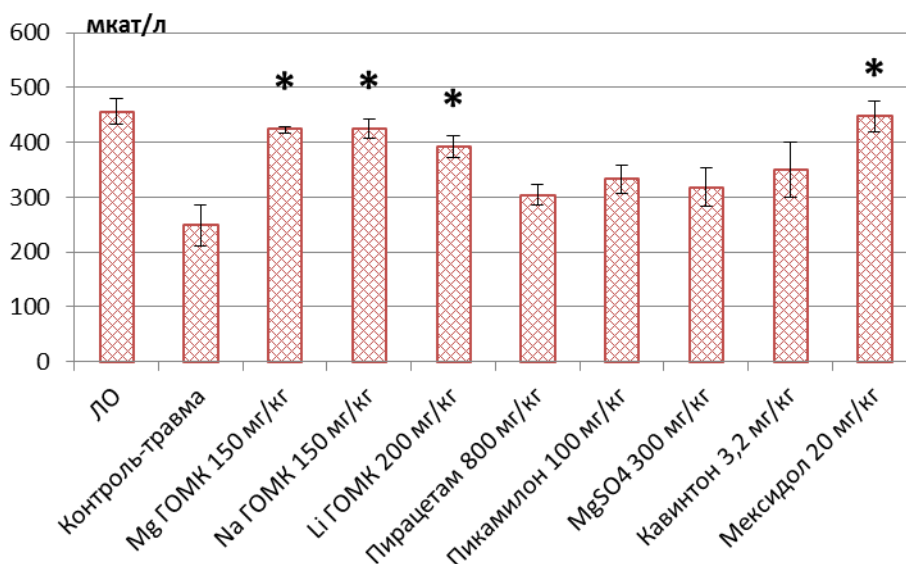


Рис.22. Изменение активности каталазы (мкат/л) после моделирования травмы головного мозга и введения исследуемых соединений и препаратов сравнения.

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-GOMK - магния оксibuтират, Na-GOMK - натрия оксibuтират, Li-GOMK - лития оксibuтират, *- различия статистически достоверны по q-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных при $p < 0,05$

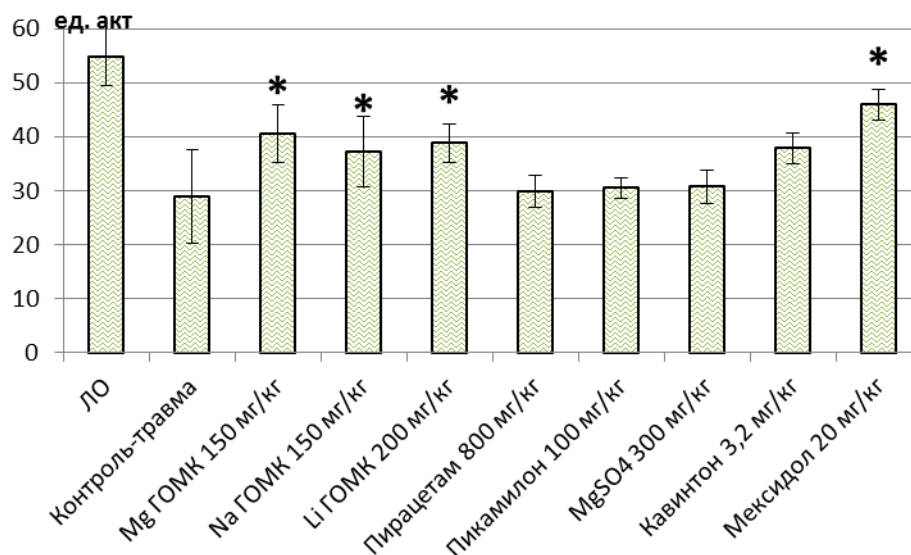


Рис.23. Изменение активности СОД (ед. акт.) после моделирования травмы головного мозга и введения исследуемых соединений и препаратов сравнения

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, *- различия статистически достоверны по *q*-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных при $p < 0,05$

В группах, получавших препараты сравнения пирацетам, пикамилон, магния сульфат и кавинтон не наблюдалось статистически значимых различий.

Таким образом, полученные данные свидетельствует о наличии сниженной интенсивности процессов ПОЛ и повышенной активности ключевых ферментов антиоксидантной системы на фоне травмы мозга, которые получали исследуемые соединения магния, натрия и лития оксibuтираты.

7.3.2. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на гемолиз эритроцитов в условиях травматического повреждения головного мозга.

Интенсификация процессов ПОЛ и метаболический ацидоз, возникающие при ишемии головного мозга в связи с переходом на анаэробный путь окисления глюкозы способствуют повреждению клеточных мембран. Наиболее чувствительными признаны эритроциты, поэтому оценка продолжитель-

ности гемолиза эритроцитов может косвенно говорить об интенсивности течения ацидоза, процессов ПОЛ и степени повреждения клеточных мембран, в том числе и нейронов головного мозга. В связи с чем, проведено изучение влияния исследуемых соединений на продолжительность кислотного гемолиза эритроцитов. В качестве гемолизирующего фактора использовали 0,004 н НСІ.

Продолжительность кислотного гемолиза эритроцитов в контрольной группе животных составила в среднем $4,7 \pm 0,15$ минуты, что было статистически значимо ниже в 1,5 раза, чем в группе ложнооперированных животных (Рис. 24).

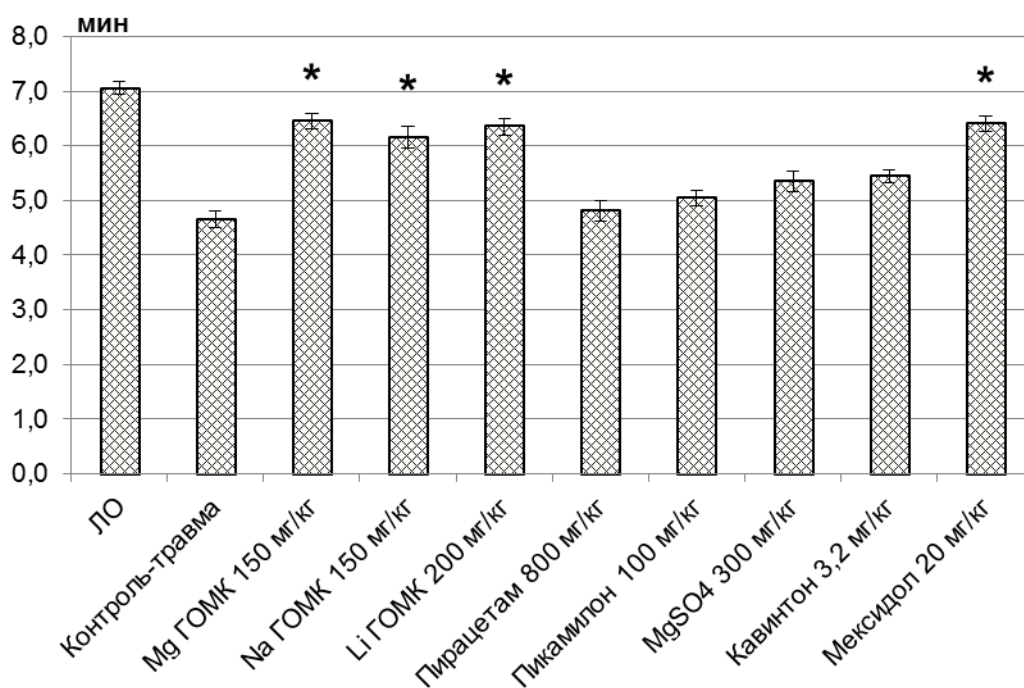


Рис. 24. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на продолжительность (мин) кислотного гемолиза эритроцитов после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при моделировании травмы головного мозга

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, * - $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных (ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса, критерий Данна).

Введение соединений магния, натрия и лития оксibuтиратов и препарата сравнения мексидол повышало устойчивость клеточных мембран эрит-

роцитов в условиях кислотного воздействия, что выражалось в статистически значимом увеличении времени гемолиза до 6,2-6,4 минут, чем в контрольной группе. Эти данные свидетельствуют о положительном мембранопротекторном влиянии магния, натрия, лития оксибутиратов.

7.3.3. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на утилизацию глюкозы мозговой тканью в условиях травматического повреждения головного мозга.

Известно, что одним из звеньев патогенеза ишемии головного мозга является резкое снижение потребления тканью мозга основного энергетического субстрата – глюкозы [139; 28]. Это связано с тем, что в условиях кислородного голодания, обусловленного ишемической гипоперфузией, активируется анаэробный путь утилизации глюкозы [47].

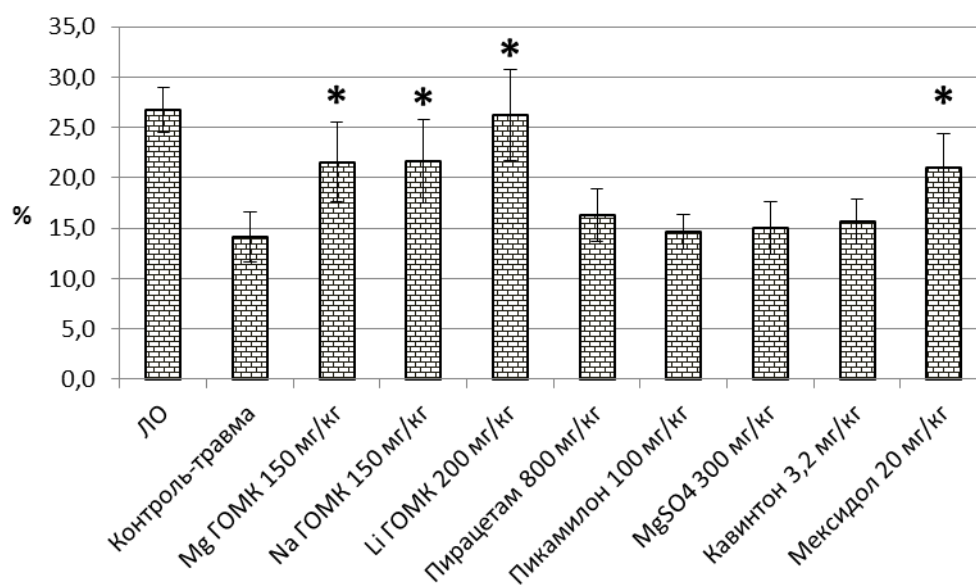


Рис. 25. Утилизация глюкозы мозговой тканью (%) после фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при моделировании травмы головного мозга

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с контрольной группой животных ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса.

По сравнению с ложнооперированными животными у контрольной группы отмечалось статистически значимое снижение утилизация глюкозы мозгом (Рис. 25).

Соединения магния и натрия оксибутираты, а также препарат сравнения мексидол статистически значительно повышали процент утилизации глюкозы мозгом в условиях ишемии, увеличивая артериовенозную разницу концентрации данного метаболического субстрата в среднем на 20-23%, что может рассматриваться как один из механизмов их нейропротекторного действия. У крыс, получавших препараты сравнения пирацетам, пикамилон и магния сульфат процент утилизации глюкозы был несколько выше группы контроля, однако данные изменения не были статистически значимы (Рис. 25).

7.4. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на гемореологические показатели на фоне травматического повреждения головного мозга у крыс

В патогенезе ишемии головного мозга важную роль играет нарушение сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза [66; 45]. Продукты расложения ткани мозга являются источником поступления в кровь тканевого фактора и других активных веществ, обладающих прокоагулянтными свойствами. Это приводит к прогрессивному нарастанию коагулопатического потенциала крови, стойкой гиперкоагуляции, за которой неизбежно следует срыв противосвертывающих механизмов [27]. Учитывая тот факт, что имеются литературные данные о возможной взаимосвязи терапевтического действия ГАМК-ергических средств при нарушениях мозгового кровообращения с их влиянием как на антиагрегантную активность сосудистой стенки, так и на агрегацию тромбоцитов [1; 41], мы посчитали целесообразным изучить влияние солей гамма-оксимасляной кислоты на систему гемостаза в условиях травматического повреждения мозга. С этой целью был использован комплексный подход, который позволил оценить состояние клеточного (сосудисто-тромбоцитарного) и плазменного (коагуляционного) компонентов гемостаза у крыс, перенесших травматическое повреждение головного мозга.

7.4.1. Изучение влияние введения солей гамма-оксимасляной кислоты на тромбоцитарный компонент гемостаза у животных с травматическим повреждением головного мозга.

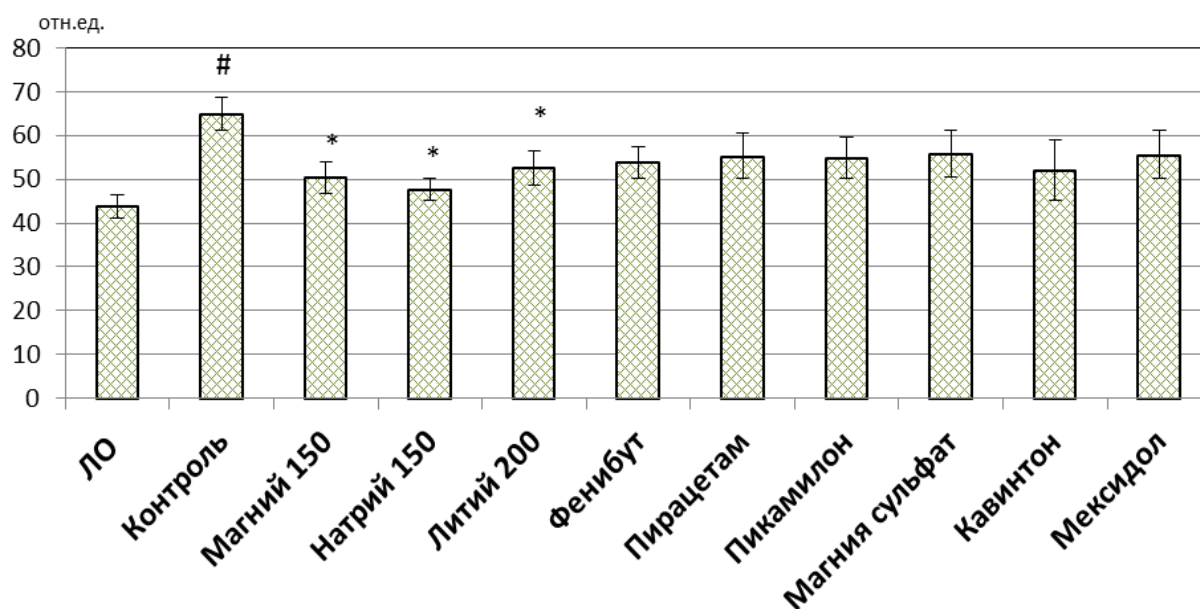
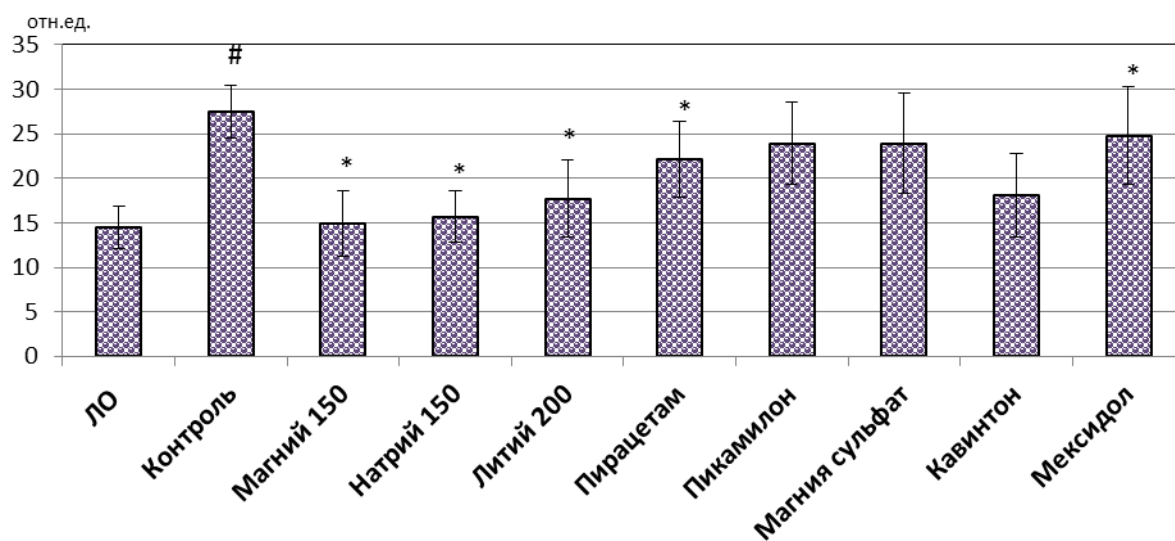
Установлено, что активация тромбоцитов, являясь связующим звеном факторов риска цереброваскулярных заболеваний и тромботическим повреждением сосудистого эндотелия, сопровождается изменением реологических свойств крови, нарушением ангиогемических взаимодействий и микроэмболией мелких ветвей сосудистого бассейна [45]. Наиболее распространенным способом оценки агрегации тромбоцитов является исследование скорости и степени уменьшения оптической плотности (увеличения светопропускающей способности) тромбоцитарной плазмы при перемешивании с индукторами агрегации на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (в нашем исследовании использовался агрегометр научно-производственной фирмы «Био-ла», г. Москва). Метод определения агрегации тромбоцитов подробно описан в главе 2.

Экспериментально вызванная травма головного мозга у крыс приводила к повышению агрегации тромбоцитов, что проявлялось в статистически значимом увеличении степени агрегации тромбоцитов на 89,5% ($p < 0,05$) и скорости агрегации тромбоцитов на 48% в контрольной группе ($p < 0,05$) относительно группы ложноперитонизированных животных (Рис.26).

У животных, получавших исследуемые соединения и в меньшей степени препарат сравнения мексидол, степень, а также скорость агрегации тромбоцитов, индуцированная введением АДФ, были статистически ниже по сравнению с контрольной группой животных (Рис.26 Б).

У животных, которым вводились оксибутираты магния, натрия и лития с экспериментальной травмой головного мозга статистически значимо при $p < 0,05$ во всех группах регистрировалась более низкая скорость агрегации тромбоцитов на 22,5%, 26,5% и 19,0% соответственно (Рис. 26 Б).

А



Б

Рис. 26. Влияние солей гамма-оксимасляной кислоты и препаратов сравнения на степень (А) и скорость (Б) агрегации тромбоцитов на фоне введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при моделировании отека головного мозга

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, #, при $p < 0,05$; *- различия статистически достоверны по q -критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных соответственно при $p < 0,05$

7.4.2. Изучение влияния введения солей гамма-оксимасляной кислоты на плазменный (коагуляционный) гемостаз у животных с травматическим повреждением головного мозга.

Плазменный или коагуляционный гемостаз, представляет собой каскад реакций, в которых участвуют факторы свертывания крови, завершающийся процессом образования нитей фибрина, на которые затем оседают форменные элементы с последующим формированием тромба. Образовавшийся, при разрушении тромба, фибрин подвергается далее разрушению под влиянием пламина. Процесс плазменного гемостаза можно условно разделить на 3 фазы: 1) образование протромбиназы; 2) образование тромбина; 3) образование фибрина.

Основу настоящего исследования плазменного гемостаза составляют следующие коагуляционные тесты: определение протромбинового (ПВ), активированного частично тромбопластинового (АЧТВ) и тромбинового времени (ТВ), а также определение концентрации фибриногена. Они позволяют оценить три основных механизма коагуляционного каскада, а именно, внешний, внутренний и общий пути свертывания. Так ПВ дает информацию о функциональном состоянии компонентов так называемой экзогенной коагуляционной системы, которая индуцируется высвобождением тромбопластина из поврежденной ткани, в то время как тест АЧТВ позволяет оценить статус компонентов, участвующих в эндогенной коагуляционной системе, инициирующейся контактной активацией фактора XII. Тесты ТВ и определение фибриногена позволяют судить о статусе конечного этапа свертывания.

В нашей работе с целью проведения комплексной оценки функционального взаимодействия компонентов системы гемостаза, повышения информативности и точности коагулологических исследований помимо указанных выше тестов был использован анализатор АРП-01 «МЕДНОРД» (Россия), который обеспечивал автоматическую регистрацию параметров процесса свертывания крови и ее фибринолитической активности [63]. В течение

исследования автоматически строилась кривая, по которой рассчитывались амплитудные и хронометрические константы, характеризующие основные этапы гемокоагуляции и фибринолиза.

Первая фаза плазменного гемостаза – образование протромбиназы, представляет собой многоступенчатый процесс, в результате которого в крови накапливается комплекс факторов, способных трансформировать протромбин в тромбин, поэтому комплекс называется протромбиназой. Показателем, характеризующим первую фазу, является АЧТВ – время образования сгустка в цитратной бестромбоцитной плазме после добавления суспензии синтетических фосфолипидов с микрокристаллическим кремнием и CaCl_2 .

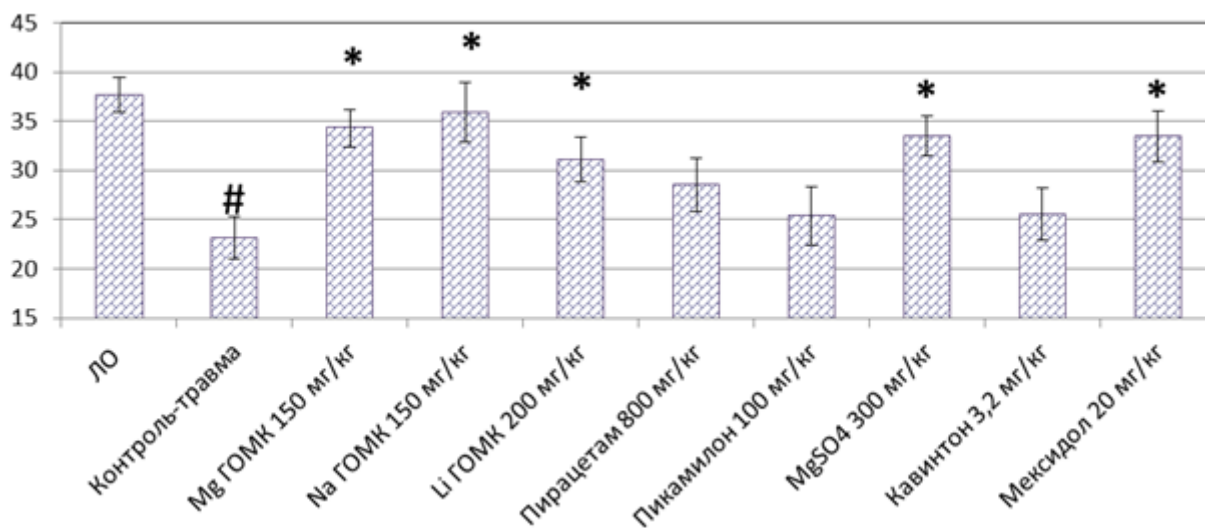


Рис. 27. Активированное частично тромбопластиновое время после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при моделировании травмы головного мозга

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, # - различия статистически достоверны по q-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями ложнооперированных животных (ЛО) при $p < 0,05$; *- различия статистически достоверны по q-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных при $p < 0,05$.

В проведенном нами исследовании на фоне травмы головного мозга наблюдалось значительное статистически значимое укорочение АЧТВ по сравнению с группой ложнооперированных животных на 38,5% ($p < 0,05$), что

свидетельствует о наличии плазменных дефектах в I фазе свертывания крови (Рис. 27).

У животных, которым вводились исследуемые соединения магния, натрия и лития оксибутираты, а также препараты сравнения магния сульфат и мексидол по отношению с контрольной группой отмечалось статистически значимое удлинение АЧТВ соответственно на 48%, 54,9%, 34,3%, 43% и 44% ($p < 0,05$).

Для характеристики второй фазы плазменного гемостаза традиционно используют показатель ПВ, который отражает активность протромбинового комплекса (факторов VII, V, X и собственно протромбина – фактора II).

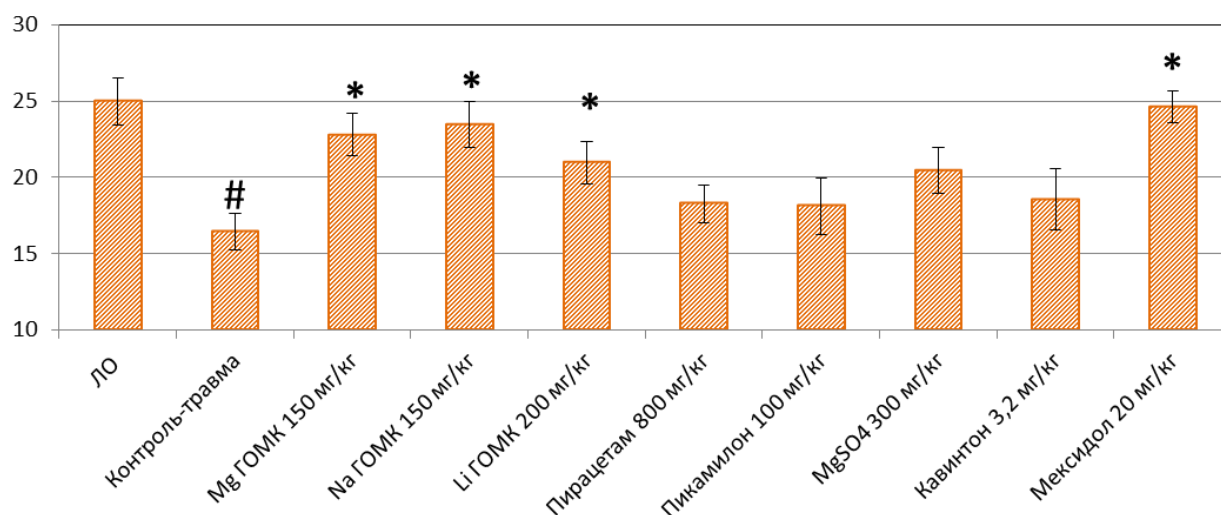


Рис. 28. Протромбиновое время после введения исследуемых соединений и препаратов сравнения при моделировании травмы головного мозга

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, # - различия статистически достоверны по q -критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями ложнооперированных животных (ЛО) при $p < 0,05$; * - различия статистически достоверны по q -критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных при $p < 0,05$.

В контрольной группе животных с травматическим повреждением мозга, получавших физиологический раствор отмечалось укорочение данного показателя на 34,2% ($p < 0,05$) относительно ложнооперированной группы животных. У крыс, которые получали исследуемые соединения и мексидол,

наблюдалось удлинение ПВ на 38,5% (магния оксибутират), 42,7% (натрия оксибутират), 27,5% (лития оксибутират), 24,3% (мексидол) соответственно по сравнению с группой контрольных животных (Рис. 28). Полученные данные свидетельствуют об уменьшении выраженности гиперкоагуляции, возникающей при моделировании отека головного мозга у животных на фоне применения исследуемых соединений.

Со стороны показателей коагуляционного гемостаза наблюдалось статистически значимое снижение временных параметров, полученных с помощью анализатора реологических свойств крови (АРП-1) (Таблица 22). У контрольных животных с травмой головного мозга отмечалось значительное укорочение периода ретракции (r), который характеризует первую, и вторую, фазы процесса свертывания крови, отражает протромбиновую активность крови и время начала образования сгустка, позволяет судить о функциональном состоянии прокоагулянтного звена системы гемостаза и служит диагностическим свидетельством хронометрической гиперкоагуляции. Кроме того, укорочение ПВ и АЧТВ также соотносилось с укорочением на 37% Т (константы тотального свертывания крови) у контроля по сравнению с ложнооперированной группой животных. Она отражает функциональное состояние не только прокоагулянтного звена гемостаза, но и антикоагулянтную активность. При анализе результатов, полученных у животных под влиянием исследуемых соединений, выяснилось, что магния, натрия и лития оксибутираты и в меньшей степени мексидол приводили к достоверному удлинению r и Т по сравнению с контрольной группой (Таблица 22).

Третья фаза – это фибринообразование. Возникший тромбин отщепляет от молекулы фибриногена два пептида А и В, переводит его в фибрин – мономер, который под воздействием других факторов превращается в медленно и ограниченно растворимую форму, составляющую основу кровяного сгустка.

Таблица 22.

Показатели коагуляционного гемостаза у животных после моделирования отека головного мозга и введения исследуемых соединений и препаратов сравнения

| Группы животных | Показатели | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|
| | г, мин | к, мин | АМ, отн.ед. | Т, мин | F, % | kk | t, мин |
| ЛО | 2,99± 0,07 | 2,04± 0,12 | 691± 46 | 44,47 1,82 | 18,05± 0,82 | 55,02± 4,88 | 40,60± 7,05 |
| Контроль-травма | 1,85± 0,14 [#] | 1,32± 0,07 [#] | 994± 60 [#] | 28,07± 1,57 [#] | 9,98± 0,53 [#] | 87,13± 6,26 [#] | 26,38± 1,56 |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 2,66± 0,07* | 1,98± 0,08* | 746± 60* | 36,02± 0,74* | 12,58± 0,32* | 61,22± 5,54* | 34,00± 2,20 |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 2,82± ±0,12* | 1,93± 0,08* | 638± 76* | 37,90± 2,68* | 13,3± 0,42* | 64,93± 5,01* | 32,23± 5,24 |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 2,46± ±0,09* | 1,78± 0,09* | 740± 53* | 38,10± 1,22* | 12,67± 0,44 | 67,18± 5,08* | 30,30± 4,25 |
| Пирацетам 800 мг/кг | 2,26± 0,09 | 1,72± 0,11* | 802± 44* | 34,15± 2,41 | 11,22± 0,65 | 66,73± 3,77* | 27,20± 2,24 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 2,33± 0,16 | 1,79± 0,14 | 881± 86 | 34,15± 2,41 | 10,93± 0,73 | 76,78± 5,44 | 29,27± 2,86 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 2,14± 0,13 | 1,76 0,14 | 929± 75 | 34,22± 2,71 | 11,38± 0,55 | 86,85± 7,53 | 28,03± 2,67 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 2,06± 0,10 | 1,59± 0,12 | 897± 103 | 31,25± 1,06 | 11,35± 0,63 | 88,33± 8,97 | 28,75± 2,40 |
| Мексидол 20мг/кг | 2,80± 0,08* | 1,89± 0,10* | 750± 38* | 34,67± 1,88* | 11,68± 0,66 | 71,13± 4,71* | 31,82± 2,64 |

Обозначения: ЛО- ложнооперированные, Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, г – временной показатель протромбиновой активности, к – временной показатель тромбиновой активности, АМ – фибрин-тромбоцитарная константа крови, Т – время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка, F – суммарный показатель ретракции и спонтанного лизиса сгустка, kk – показатель тромбиновой активности, t – константа свертывания крови; [#]- различия статистически достоверны по q-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями ложнооперированных животных (ЛО) соответственно при $p < 0,05$; *- различия статистически достоверны по q-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных соответственно при $p < 0,05$.

Показателем, характеризующим третью фазу, является тромбиновое время и концентрация фибриногена в плазме. ТВ – время, необходимое для образования сгустка фибрина в плазме при добавлении к ней тромбина. Оно зависит от концентрации фибриногена и активности ингибиторов тромбина и оценивается как третья фаза свертывания крови, так и состояние естественных и патологических антикоагулянтов.

На фоне травматического повреждения головного мозга у животных происходило снижение антикоагулянтной активности крови, что подтверждалось статистически значимым снижением ТВ на 22,7% ($p < 0,05$) у животных контрольной группы по сравнению ложнооперированными животными (Рис.29).

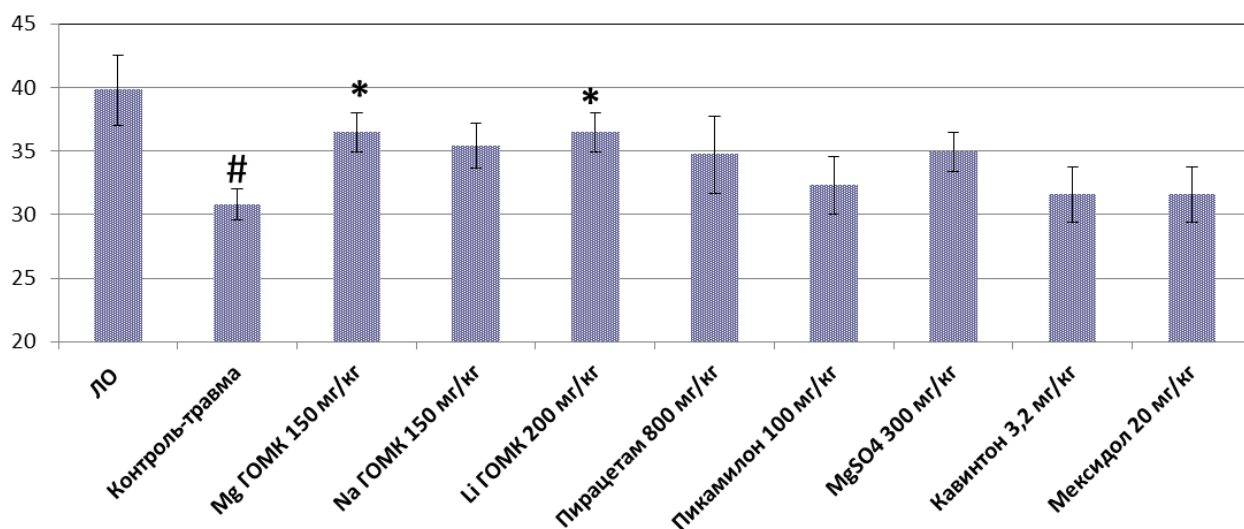


Рис. 29. Тромбиновое время у животных после моделирования травмы головного мозга после и введения исследуемых соединений и препаратов сравнения

Обозначения: ЛО- ложнооперированные животные, Mg-ГОМК - магния оксibuтират, Na-ГОМК - натрия оксibuтират, Li-ГОМК - лития оксibuтират, # - различия статистически достоверны по q-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями ложнооперированных животных (ЛО) при $p < 0,05$; * - различия статистически достоверны по q-критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных при $p < 0,05$.

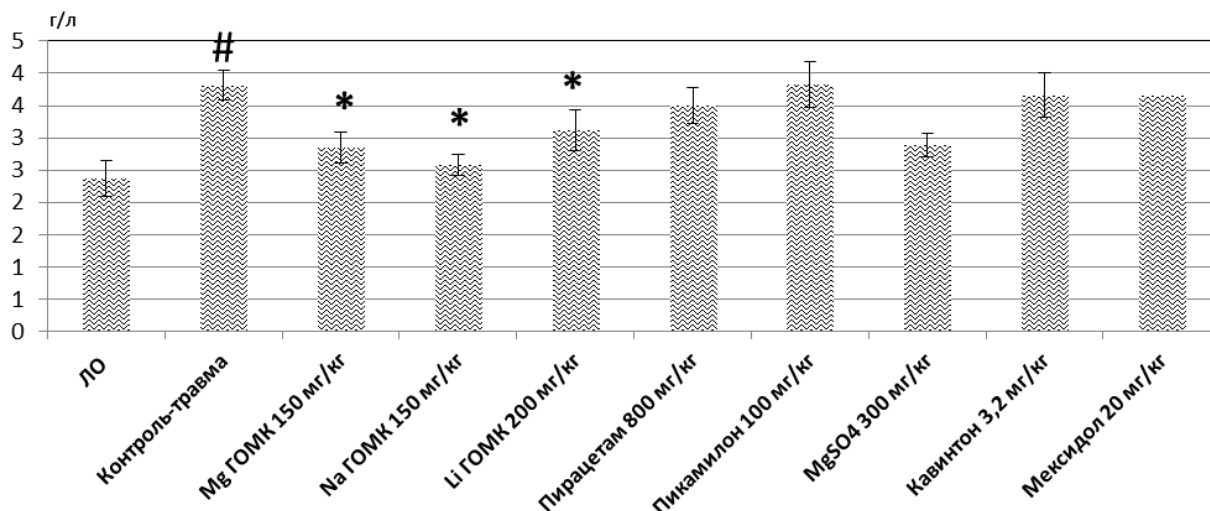


Рис. 30. Влияние исследуемых соединений и препаратов сравнения на содержание фибриногена у крыс с травмой головного мозга.

Обозначения ЛО- ложнооперированные животные, Mg-GOMK - магния оксибутират, Na-GOMK - натрия оксибутират, Li-GOMK - лития оксибутират, # - различия статистически достоверны по q -критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями ложнооперированных животных (ЛО) при $p < 0,05$; * - различия статистически достоверны по q -критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с показателями контрольной группы ишемизированных животных при $p < 0,05$.

Под влиянием исследуемых соединений произошло удлинение ТВ, в большей степени у соединений магния (на 18,4%) и лития (на 18,5%) оксибутиратов, что статистически значимо относительно показателя контрольной группы животных при $p < 0,05$.

У животных в контрольной группе с травмой головного мозга концентрация фибриногена в плазме статистически значимо повышалась в среднем на 61% ($p < 0,05$) по сравнению с группой ложнооперированных животных (Рис. 30), что приводит к увеличению вязкости крови у животных данной группы. Под влиянием исследуемых соединений наблюдалось статистически значимое снижение содержания фибриногена, так при применении магния оксибутирата на 25,2%, натрия оксибутирата на 32,4%, лития оксибутирата на 18,2% по отношению к группе контрольных животных.

Одной из характеристик процесса фибринообразования, наряду с содержанием фибриногена в плазме (г/л) может служить фибрин - тромбоцитарная константа сгустка (АМ), которая отражает реологические свойства

образовавшегося сгустка (вязкость, плотность, пластичность), а также константа свертывания крови (t).

У группы животных с травмой головного мозга наблюдались более активное фибринообразование, отражением которого стало увеличение показателя АМ (на 44%) и уменьшение показателя t (на 35%) по сравнению с показателями группы ложнооперированных животных (Таб. 22).

Введение животным с травмой головного мозга соединений магния, натрия, лития оксибутиратов и мексидола приводило к статистически значимому снижению значения АМ на 24,9%, 35,8%, 25,6% и 24,5% соответственно. При этом константа свертывания крови (t) увеличивалась на 28,9 % (магния оксибутират), 22% (натрия оксибутират), 14% (лития оксибутират), 20% (мексидол) по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что в контрольной группе животных с травмой головного мозга коагуляционный компонент гемостаза характеризовался гиперкоагуляционным сдвигом (снижением показателей r, k, T, АЧТВ, ПВ, ТВ, повышением kк), возрастанием фибрин-тромбоцитарной константы крови (АМ), а также концентрации фибриногена в плазме крови. Вместе с тем происходило снижение суммарного показателя ретракции и спонтанного лизиса сгустка (F) на 44,7%, который характеризует интенсивность фибринолиза. Лечебное введение магния, натрия и лития оксибутиратов и, в меньшей степени, мексидола уменьшало степень выраженности нарушений в системе гемостаза, снижая коагуляционную и повышая фибринолитическую активность крови.

7.5 Изучение противоотечного действия солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании ишемического и травматического повреждения головного мозга у крыс.

7.5.1 Изучение противоотечного действия солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании ОСА у крыс.

Воспроизведение билатеральной окклюзии общих сонных артерий у крыс приводило к формированию отека головного мозга, что выражалось в статистически значимом повышении содержания воды в тканях мозга у крыс контрольной группы животных на 2,8% ($79,97 \pm 0,23\%$) по сравнению с показателями группы ложнопериорированных животных (Таблица 23).

Введение солей ГОМК и некоторых препаратов сравнения частично препятствовало развитию отека головного мозга у животных. Так статистически значимое снижение содержания воды в церебральных тканях составило 2,11%, 2,24% и 2,00% в группах животных, получавших магния, натрия и лития оксибутираты соответственно ($p < 0,05$). Из препаратов позитивного контроля был отмечен кавинтон, который снижал содержание воды в тканях мозга на 1,82%, что также имело достоверный характер ($p < 0,05$). Другие препараты хотя и снижали содержание воды, однако, это изменение не носило достоверный характер. Стоит отметить, что при попарном сравнении была выявлена статистически значимое различие между показателями животных, получавших магния оуссибутират и кавинтон при $p < 0,05$.

Таблица 23

Содержание воды в мозговой ткани животных, после моделирования ОСА головного мозга животных и введения исследуемых соединений и препаратов сравнения, %

| Группы | Содержание воды в головном мозге, % | Δ% содержания воды по сравнению с контрольной группой животных |
|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Ложнооперированные | 77,76±0,09* | - |
| Контроль-ишемия | 79,97±0,23 | - |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 78,18±0,06* | - 2,24*& |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 78,28±0,05* | - 2,11* |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 78,37±0,14* | - 2,00* |
| Пирацетам 800 мг/кг | 79,14±0,10 | - 1,69 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 78,90±0,08 | - 1,04 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 78,40±0,09 | - 1,10 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 78,45±0,05* | - 1,82* |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, & - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с группой животных, получавших кавинтон * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений).

7.5.2 Изучение противоотечного действия солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании гравитационной ишемии головного мозга у крыс.

Гравитационные перегрузки у крыс приводили к формированию отека головного мозга у крыс, выражающийся в статистически значимом повышении процента гидратации тканей на 2,75% в группе контрольных животных (79,93%±0,12%) по сравнению с группой интактных животных. (77,79%±0,09%) (Таб. 24).

Введение солей ГОМК статистически значимо препятствовало формированию отека тканей мозга у крыс, так в группах исследуемых соединений были зафиксированы следующие показатели - снижение содержания воды в мозге на 1,67%, 1,76% и 1,43% в группах животных, получавших магния, натрия и лития оксибутираты соответственно ($p < 0,05$).

Таблица 24.

Процент гидратации мозговой ткани животных, после моделирования гравитационной ишемии головного мозга животных и введения исследуемых соединений и препаратов сравнения, %

| Группы | Содержание воды в головном мозге, % | $\Delta\%$ содержания воды по сравнению с контрольной группой животных |
|-------------------------|-------------------------------------|--|
| Интакт | 77,79±0,09* | |
| Контроль-ишемия | 79,93±0,12 | |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 78,59±0,08* | - 1,67* |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 78,52±0,06* | - 1,76* |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 78,79±0,06 * | - 1,43* |
| Пирацетам 800 мг/кг | 79,26±0,08 | - 0,84 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 78,83±0,07 | - 1,37 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 78,85±0,19 | - 1,34 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 78,82±0,06 | - 1,33 |

Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений).

7.5.3 Изучение противоотечного действия солей гамма-оксимасляной кислоты при моделировании травматического повреждения головного мозга у крыс.

Было отмечено, что в контрольной группе животных моделирование травмы мозга повышает содержание воды в среднем до 80,15%. (Таблица 25)

В группах животных, получавших магния и лития оксибутираты, было отмечено статистически значимое снижение содержания воды в головном мозге у крыс на 2,86% и 2,57%, соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, при моделировании ишемического и травматического повреждения головного мозга у животных формируется отек церебральных тканей разной степени тяжести. Исследуемые соединения препятствуют формированию отека, статистически значимо снижая содержание воды в тканях мозга относительно контрольной группы животных. По выраженности эффекта следует выделить магния и лития оксибутираты, которые на мо-

дели травматического повреждения способствовали снижению содержанию воды в мозге в отличии от других соединений. Стоит отметить, что самые низкие показатели, а следовательно самый выраженный противоотечный эффект был зафиксирован у животных, получавших магния оксибутират.

Таблица 25.

Процент гидратации мозговой ткани животных, после моделирования отека головного мозга животных и введения исследуемых соединений и препаратов сравнения, %

| Группы | Содержание воды в головном мозге, % | Изменение содержания воды по сравнению с контрольной группой животных, % |
|-------------------------|--|---|
| Ложнооперированные | 77,80±0,03* | - |
| Контроль-ишемия | 80,15±0,16 | - |
| Mg-ГОМК 150 мг/кг | 78,16±0,09* | - 2,86* |
| Na-ГОМК 150 мг/кг | 78,67±0,09 | - 2,22 |
| Li-ГОМК 200 мг/кг | 78,39±0,12 * | - 2,57* |
| Пирацетам 800 мг/кг | 78,76±0,09 | - 2,11 |
| Пикамилон 100 мг/кг | 78,80±0,14 | - 2,06 |
| Магния сульфат 300мг/кг | 78,52±0,07 | - 2,41 |
| Кавинтон 3,2 мг/кг | 78,54±0,09 | - 2,39 |
| Мексидол 20 мг/кг | 78,70±0,10 | - 2,18 |

*Обозначения: Mg-ГОМК - магния оксибутират, Na-ГОМК - натрия оксибутират, Li-ГОМК - лития оксибутират, * - $p < 0,05$ - различия достоверны по сравнению с ишемизированной группой контрольных животных (Ранговый однофакторный анализ, критерий Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений).*

7.5. Заключение.

В настоящем блоке исследования мы оценили влияние исследуемых соединений на последствия ишемического, гипоксического и травматического повреждения головного мозга и организма в целом. Показано, что исследуемые соединения магния, натрия и лития оксибутират обладают с одной стороны антигипоксическими свойствами и способностью улучшать мозговое кровообращения. С другой стороны были отмечены положительные изменения со стороны антиоксидатной и гемостатической систем крови животных, предотвращение нарастания патологического процесса отека тканей. При оценке состояния антиоксидантной системы, утилизации глюкозы моз-

говой тканью, устойчивости мембран эритроцитов и некоторых показателей сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, было показано, что у животных, которые получали исследуемые соединения, патологические изменения носили статистически значимо менее выраженный характер относительно группы контрольных животных. Помимо этого исследуемые соединения статистически значимо снижали выраженность эндотелиальной дисфункции, о чем свидетельствует более выраженный ответ на введение модификаторов синтеза оксида азота. Отек мозговой ткани, возникающий, при травматическом и ишемическом повреждении головного мозга, был менее выражен у животных, получавших магния, натрия и лития оксибутираты, их показатели статистически значимо отличались от аналогичных в группе негативного контроля. Стоит отметить, что самые низкие показатели, а следовательно самый выраженный противоотечный эффект был зафиксирован у животных, получавших магния оксибутират.

Мы предполагаем, что ведущим компонентом действия указанных выше соединений, является их положительное метаболическое действие, а также регуляция тонуса мозговых сосудов. Способность регулировать мозговой кровоток связано, по-видимому, с ГАМК стимулирующим эффектом указанных соединений, однако различия в химической структуре производных гамма-оксимасляной кислоты, вероятно, вносят определенные изменения в спектр фармакологической активности магния, натрия и лития оксибутиратов. Замена катиона в указанных солях также меняет выраженность фармакологического воздействия на различные звенья патогенеза.

Глава 8. Результаты и обсуждения.

Острые нарушения мозгового кровообращения являются неотъемлемыми компонентами патогенеза различных заболеваний сердечно-сосудистой системы, в связи с этим на сегодняшний день они представляют собой особо актуальную проблему для здравоохранения в целом. Широкое распространение, молниеносное течение и высокий риск летального исхода являются серьезным препятствием перед практикующими специалистами в сокращении заболеваемости данного вида патологии. Несмотря на многолетнее изучение цереброваскулярных расстройств, и последующее внедрение в реальную клиническую практику фармакологических препаратов, невозможно говорить об успешном контроле таких нарушений у пациентов. Имеющийся арсенал лекарственных средств, применяющихся при различных нарушениях мозгового кровообращения, не в полной мере удовлетворяет клинических специалистов при отсутствии требуемого уровня эффективности и безопасности. В связи с этим для исследователей основой новых фармакологических средств являются, прежде всего, вещества с поливалентным действием, которые способны влиять на различные звенья патогенеза нарушений мозгового кровообращения.

Так, одним из ярких представителей этого класса веществ является ГОМК. Она является одним из основных нейромодуляторов ЦНС, который влияет при этом на функцию нейротрансмиттерных систем, таких как дофаминергическая и ГАМК-ергическая системы и других. Несмотря на открытие, изучение и применение этого вещества началось с середины XX века, полный спектр позитивных свойств этого ряда соединений еще не раскрыт. К тому же существующие ограничения, вероятно, ограничивают клиническое применение этих соединений.

Изменение катиона солей ГОМК может модифицировать или усиливать эффекты основного соединения. В связи с этим представлял теоретиче-

ский и практический интерес изучение фармакологической активности магниевой соли ГОМК, в связи, с чем на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ был внедрен ряд моделей и методик для оценки церебропротекторных свойств исследуемого соединения.

Так в своих исследованиях мы оценили церебропротекторные свойства магниевой, натриевой и литиевой солей ГОМК в дозах 100, 150 и 200 мг/кг при различных нарушениях мозгового кровообращения, установили возможные аспекты механизма их действия. В основу оценки церебропротективного действия исследуемых соединений мы включили тест-системы *in vivo* и *in vitro*, позволяющие провести комплексный анализ функционального состояния животных, мозгового кровотока, его метаболизма и возможных механизмов церебропротективного действия при различных нарушениях мозгового кровообращения. При анализе возможных механизмов действия мы не использовали фармакологический анализ, так как медиаторные механизмы ГОМК в целом известны [86; 99; 121]. Для повышения репрезентативности исследований все экспериментальные работы проводили на предварительно типизованных животных, которые формировались в группы по принципу рандомизации.

На начальных этапах настоящего исследования церебропротективное действие магния, натрия и лития оксибутиратов оценивали по их влиянию на выживаемость животных, неврологический статус, поведенческий дефицит, сохранность уровня мозгового кровотока, функциональное состояние эндотелия в условиях необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий и гравитационной ишемии. Церебропротективное действие соединений оценивали, в сравнении с препаратами, имеющими в своем составе измененную молекулу ГАМК (пикамилон). Дополнительно эффекты соединений сравнивались с аналогичными у первого и классического ноотропа – пирацетама, препарата широко применяемого в терапии нарушений МК – кавинтона, и препарата магния сульфата.

При двусторонней окклюзии общих сонных артерий, было установлено, что показатель летальности через 3 суток после перевязки артерий, был статистически значимо ниже у животных, которым предварительно однократно внутривенно вводили магния оксидутират в дозе 150 мг/кг, и лития оксидутират в дозе 200 мг/кг по отношению к группе животных получавших физиологический раствор. В ходе исследования также было обнаружено, что введение при моделировании ишемического повреждения головного мозга, статистически значимо препятствовало выраженному нарастанию у животных неврологической симптоматики, выражающейся в снижении баллов по шкалам неврологического дефицита McGraw, Combs и D'Alecy. В этих группах животных также отмечались повышенные показатели локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности животных, уменьшалась выраженность нарушений со стороны памяти. Уровень локального мозгового кровотока у животных, получавших соли ГОМК, также регистрировался на более высоком уровне, чем у животных групп позитивного и негативного контроля. Оценка функционального состояния эндотелия сосудов головного мозга этих животных выявила менее значимые нарушения вазодилатирующей функции эндотелия, о чем свидетельствует адекватный сосудистый ответ на введение ацетилхолина. Таким образом, результаты данной экспериментальной серии позволили сделать вывод о перспективности дальнейшего исследования соединений в наиболее активных дозах.

Для подтверждения церебропротекторных свойств солей ГОМК, следующий этап исследования проводился на другой модели экспериментального нарушения мозгового кровообращения, которая не требует проведения хирургического вмешательства и использования наркотизации животного, а ишемия головного мозга создается путем воздействия дозированных радиальных ускорений. В результате исследования, установлено, что продольные радиальные ускорения в кранио-каудальном векторе приводили к гибели 30% животных контрольной группы, появлению неврологической симптоматики

средней степени тяжести, возникновению неврологического, поведенческого и когнитивного дефицита. Однократное введение животным соединений магния, натрия оксибутиратов в дозе 150 мг/кг и лития оксибутирата в дозе 200 мг/кг оказывало выраженное защитное действие. Так происходило предотвращение нарастания неврологического дефицита, нарушений исследовательского поведения и памяти. Оценка уровня локального мозгового кровотока и функционального состояния эндотелия мозговых сосудов, показала, что введение животным солей ГОМК приводило к достоверному повышению скорости локального мозгового кровотока в отличие от такового в группах, получавших препараты сравнения (кроме кавинтона), а эндотелий-зависимая вазодилатирующая реакция мозговых сосудов в этих группах приближалась к уровню интактных животных.

Таким образом, по результатам двух экспериментальных серий, мы выявили, соединения магния, натрия и лития оксибутираты оказывают выраженное церебропротективное действие при ишемии головного мозга, в дозах 150 мг/кг, 150 мг/кг и 200 мг/кг соответственно, при их профилактическом введении. Их протективное действие было сопоставимо с таковым у препарата улучшающего мозговое кровообращение кавинтон и превосходило остальные препараты позитивного контроля.

Далее мы предприняли попытку оценить влияние курсового лечебного введения исследуемых солей ГОМК в наиболее эффективных дозах на модели фокальной ишемии головного мозга у животных с эндотелиальной дисфункцией. Введение животным солей ГОМК в соответствующих приводило к снижению неврологического дефицита у крыс, выражающееся в снижении балла по шкале Combs и D'Alecy и увеличении баллов по шкале Garcia. Также при введении этих соединений нивелировался сенсомоторный дефицит в тесте «сужающаяся дорожка» - животные совершали достоверно меньше ошибок, чем аналогичные особи в контрольной группе по мере усложнения моторной задачи на протяжении недели после моделирования. Помимо этого

мы установили позитивное влияние курсового введения исследуемых солей ГОМК на восстановление моторного дефицита конечностей у крыс в тесте «Staircase». Так, еженедельно наблюдалось увеличение количества зерен, которые животные захватывали обеими конечностями на протяжении 3 недель наблюдения и тестирования. Также введение соединений ГОМК приводило к снижению мнестического и поведенческого дефицита при моделировании фокальной ишемии головного мозга у овариоэктомизированных крыс-самок.

Далее нами была предпринята более глубокая оценка свойств соединений и некоторых аспектов механизма их действия в указанных выше дозах на модели отека головного мозга, нормобарической и гемической гипоксии у крыс. Оценка параметров фармакологической активности исследуемых соединений на модели отека позволяет более точно оценить изменения, наступающие при отеке головного мозга у животных, сопровождающего нарушения мозгового кровообращения. Введение животным солей ГОМК в соответствующих приводило к снижению неврологического дефицита у крыс на модели отека, выражающееся в снижении балла по шкале Combs и D'Alecy и увеличении баллов по шкале Garcia. Также при введении этих соединений нивелировался сенсомоторный дефицит в тесте «Сужающаяся дорожка» - животные совершали достоверно меньше ошибок, чем аналогичные особи в контрольной группе по мере усложнения моторной задачи. Введение соединений ГОМК также приводило к снижению мнестического и поведенческого дефицита при моделировании отека головного мозга.

Далее нам представлялось актуальным изучить возможные механизмы действия исследуемых соединений. Так введение крысам исследуемых соединений при моделировании нормобарической гипоксии приводило к удлинению времени до наступления апноэ, а на модели гемической гипоксии - к увеличению времени до смерти животных. Наиболее выраженным противогипоксическим действием обладает соединение магния оксибутират в дозе 150 мг/кг.

При анализе влияния исследуемых соединений на показатели антиоксидантной системы выяснилось, что при введении соединений происходит снижение интенсивности процессов ПОЛ и повышение активности ключевых ферментов антиоксидантной системы, таких как СОД, каталаза при ишемии в ткани головного мозга у животных на фоне отека. Помимо этого соли ГОМК приводят к усилению утилизации глюкозы мозгом, что может качественно повлиять на патологический процесс при нарушении мозгового кровообращения.

Отдельным блоком исследований механизмов действия исследуемых соединений стала оценка влияния на гемореологические показатели крови у животных. Так, было выяснено, что исследуемые соединения снижают скорость и степень агрегации тромбоцитов на фоне отека головного мозга.

При анализе результатов было обнаружено, что соли ГАМК влияют на степень выраженности нарушений в системе гемостаза, снижая коагуляционную и повышая фибринолитическую активность крови. В заключении при моделировании отека было выявлено уменьшение гидратации головного мозга у животных, что говорит о наличии противоотечной активности исследуемых соединений.

Действительно, накоплено много литературных данных о наличии у ГОМК нейропротекторного эффекта, который выражен при профилактическом введении [134; 110; 190; 169, 203; 228]. Кроме того, мы косвенно подтвердили вклад катиона металла в фармакологическую активность соединения в целом. Так, нейропротекторная активность магния и лития оксибутирата статистически значимо превосходила показатели контрольной группы животных в большинстве тестов, в то время как нейропротективная активность натрия оксибутирата была выявлена только на некоторых моделях. Литературный обзор статей о наличии у соединений магния и лития нейропротекторного эффекта показывает, что число публикаций на сайте pubmed.gov при запросе «нейропротекция у лития» составляет на сегодняшний день - 153

статьи, а при запросе «нейропротекция у магния» - 193. Последние исследования нейропротекторных свойств у соединений лития связаны в основном с лечением биполярных расстройств (199; 137), а у магния с нейропротекцией у плода в предродовом периоде [149; 122; 232]. Однако, механизм повреждения мозговой ткани, как при ишемическом поражении, так и при других патологиях, универсален, и существует вероятность, что дальнейшее изучение данных соединений будет в дальнейшем происходить достаточно интенсивно.

Таким образом, соединения магния, натрия и лития оксибутираты в дозах 150 мг/кг, 150 мг/кг и 200 мг/кг соответственно оказывают выраженное церебропротективное действия при профилактическом и лечебном применении на экспериментальных моделях ишемии головного мозга. Наиболее выраженным протективным действием обладает соединение магния оксибутират в дозе 150 мг/кг. Предположительно выраженность эффекта связана с наличием в молекуле катиона магния, который проявляет антагонистические свойства к иону кальция, который, в свою очередь, является ключевым звеном патологических процессов при ишемических состояниях. Можно предположить, что ведущим компонентом церебропротективного действия указанных выше солей ГОМК при нарушениях мозгового кровообращения, является их положительное модулирующее сосудистый тонус действие, противогипоксическая активность, эндотелиопозитивное действие, способность частично устранять нарушения гемореологических свойств крови и влиять на некоторые показатели антиоксидантной.

Выводы.

1. Оксibuтират магния в дозе 150 мг/кг на моделях неполной, преходящей, фокальной ишемии и травматического повреждения головного мозга оказывал выраженное снижение неврологического, поведенческого, моторного, мнестического дефицита, а также эндотелиальной дисфункции, обладал более выраженным антигипоксическим, на фоне патологии противоотечным и антиоксидантным действием, повышением мозгового кровотока;

2. В группах животных, получавших однократно профилактически оксibuтираты магния и лития в дозах 150 мг/кг и 200 мг/кг, а также препарат сравнения кавинтон, через 72 часа после окклюзии сонных артерий выживаемость была на 50% больше, а неврологический дефицит у животных, получавших магния оксibuтираты, по шкалам McGraw, а также Combs и D'Alеси был статистически значимо ниже на 3,5 и 5,5 баллов соответственно, чем в контрольной группе животных. При этом показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в группе животных, получавших магния оксibuтират, были статистически значимо выше, а время решения задачи в ТЭИ статистически значимо ниже по сравнению с группой контрольных животных, а также получавших натрия оксibuтират и другие препараты сравнения;

3. У животных, подвергшихся обратимой 5-минутной ишемии, создаваемой, путем гравитации в кранио-каудальном векторе и предварительно получавших магния оксibuтират, неврологический, поведенческий и мнестический дефицит был статистически значимо ниже, чем у животных, получавших физиологический раствор и другие препараты сравнения.

4. У животных через 4 и 7 суток после травматического повреждения головного мозга только при лечебном применении магния и лития оксibuтиратов отмечался более низкий моторный дефицит по шкалам Combs и Garcia на 4 и 8 баллов соответственно, а в тестах «сужающейся дорожки» и «лест-

нице» более низкий показатель асимметрии, чем в контрольной группе животных;

5. На 7 сутки после моделирования фокальной ишемии на фоне недостаточности половых гормонов у животных, получавших лечебное введение соединений магния и лития оксибутиратов, наблюдались статистически значимо более низкие баллы неврологического дефицита по шкалам Combs и Garcia по сравнению с контрольной группой, а также с животными, получавшими все препараты сравнения.

6. Оксибутират магния в дозе 150 мг/кг оказывал выраженные антигипоксическое действие при нормобарической и гемической гипоксии, статистически значимо увеличивая продолжительность жизни животных на 50%, и превосходил по этому виду активности препараты сравнения кавинтон, пирацетам, магния сульфат и пикамилон.

7. Лечебное введение оксибутирата магния после моделирования травматического повреждения головного мозга отмечались более высокие показатели мозгового кровотока, эндотелийзависимой вазодилатации, утилизации глюкозы мозгом, активности СОД и каталазы, и более низкие показатели накопления ТБК-активных продуктов, чем у животных контрольной группы и получавших препараты сравнения.

8. На моделях ишемического и травматического повреждения головного мозга наблюдалось выраженное противоотечное действие оксибутиратов магния. Его введение снижало выраженность отека в среднем в 2 раза по сравнению с показателями контрольной группы животных.

Научно-практические рекомендации:

1. Полученные данные свидетельствуют о выраженном нейропротективном действии оксибутирата магния на моделях ишемического и травматического повреждения головного мозга при его профилактическом и лечебном применении, что говорит о перспективности разработки на его основе лекарственного средства для лечения острых нарушений мозгового кровообращения и травм головного мозга;

2. Высокая церебропротективная активность солей гамма-оксимасляной кислоты позволяет рекомендовать химикам-синтетикам и фармакологам продолжить поиск среди ее производных новых веществ с высоким терапевтическим потенциалом.

Список сокращений:

NO – оксид азота

АДФ - аденин-динуклеотид фосфат

АЧТВ – активированное частично тромбопластиновое время

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГОМК - гамма-оксимасляная кислота

ЛО – ложнооперированные животные

МК – мозговой кровоток

НМК – нарушение мозгового кровообращения

ОП – открытое поле

ОСА – окклюзия общих сонных артерий

ОСМА – окклюзии средней мозговой артерий

ПВ – протромбиновое время

ПОЛ – перикисное окисление липидов

СОД - супероксиддисмутаза

ТБК - тиобарбитуровая кислота

ТВ – тромбиновое время

ТЭИ – тест экстраполяционного избавления

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ЦНС – центральная нервная система

ЭЗВД – эндотелийзависимая вазодилатация

Список литературы:

1. Акопян В.П. Антиагрегантная активность сосудистой стенки и возможность ее регуляции ГАМК-ергическими средствами в условиях гипокинезии / В.П. Акопян, Л.В. Едигарова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – № 5. – С.41-43.
2. Арсеньева К.Е. Ноотропные препараты в лечении цереброваскулярных заболеваний / К.Е. Арсеньева // Русский медицинский журнал. – 2007. – № 4. – С.225-229.
3. Афанасьев В.В. Патофизиологическая основа комплексной нейропротекции при ишемии мозга / В.В. Афанасьев, С.А. Румянцева, Е.В. Силина // Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова. – 2009. – № 4. – С.64-68.
4. Багметов М.Н. Церебропротекторное действие композиций фенибута и фенотропила и их солей в условиях экспериментальной ишемии головного мозга: Дис...канд. мед. наук / М.Н. Багметов, Волгоградский гос. мед. универ. – Волгоград, 2006. – 187с.
5. Баркаган З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот А.П. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 286 с.
6. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / Биленко М. В. – М. :Медицина, 1989. – 368 с.
7. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии.- М.: Медицина, 1979 г. – 157с.
8. Бондаренко Н.А. Избирательный эффект нейролептиков на нарушение дофамин-зависимого поведения у крыс в тесте экстропольяционного избавления // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1990, №11. — С. 506–508.
9. Бородкина Л.Е. Нейропротекторные свойства и механизм действия новых производных аналогов гамма-аминомасляной кислоты: Дис...докт. мед. наук/ Л.Е. Бородкина, Волгоградский гос. мед. универ. – Волгоград, 2009. – 379с.

10. Буров Ю.В. Спектр нейрофармакологической активности препарата натриевой соли никотиноил гамма-аминомасляной кислоты в эксперименте у животных / Буров Ю.В., Жуков В.Н.// Бюл. эксп. биол. и мед, - 1985. - № 5. - С. 64 - 67
11. Виленский Б.С. Инсульт. - Санкт-Петербург, 1995. - 288 с.
12. Волошин П.В., Малахов В.А., Завгородняя А.Н. Эндотелиальная дисфункция при церебральной патологии. - Харьков, 2006. - 92с.
13. Волчегорский И.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников и др. Челябинск: Изд-во Челябинского гос. пед. ун-та, 2000. С. 21-25.
14. 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.
15. Воронков А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции Автореф. дис. док. мед. наук. /А.В. Воронков. – Волгоград, 2011. –48 с.
16. Высоцкая Н.Б., Закусов В.В. Островская Р.У., Чумина З.Н. Влияние оксibuтирата натрия на окислительные процессы в мозговой ткани при гипоксии // Бюлл. Эксперим. биол, и мед. -1970. -Т 69, № 4,- С. 70-72.
17. Всемирная Организация Здравоохранения, Информационный бюллетень N°310, Май 2014 г., <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/>
18. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. Лабораторное дело, 1989, No. 10, 15-18.
19. Гаевый М.Д Фармакология мозгового кровообращения – М.: Медицина, 1980.-192с.

20. Гаевый М.Д. Влияние ГАМК и некоторых ее производных на функциональную устойчивость системы мозгового кровообращения / М.Д. Гаевый, Г.В. Ковалев // Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов; под. ред. Г.В. Ковалева. – Волгоград, 1985. – С.183-193.
21. Гаевый М.Д. Ишемия головного мозга, вызванная гравитационной перегрузкой / М.Д. Гаевый, Л.М. Аджиенко, Л.М. Макарова, А.А. Абдулсалам // Эксперим. и клин, фармакол.- 2000. – Т.63, №3. – С.63-64.
22. Ганнушкина И.В. // Журн. невропатол. и психиатр. 1996. № 1.-С. 14.
23. Ганнушкина, И. В. Мозговое кровообращение при разных видах циркуляторной гипоксии мозга / И. В.Ганнушкина // Вестник Российской Академии медицинских наук . - 2000 . - N 9 . - С. 22-27 .
24. Ганнушкина, И. В. О некоторых нерешенных вопросах патофизиологии нарушений мозгового кровообращения / И. В. Ганнушкина // Инсульт . - 2006 . - Вып.19 . - С. 3-11 .
25. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. С англ. – М. Практика, 1998. – С. 459.
26. Головкин В. Фармкласс: ишемический ОНМК и нейропротекция / В. Головкин, Я. Чернов// Российские аптеки. – 2011. – № 7. – С.34-38
27. Грицай Н.Н. Система гемостаза при нарушении мозгового кровообращения /Н.Н. Грицай, В.П. Мищенко, В.А. Пинчук // Международный неврологический журнал. – 2006. – № 5. – С.53-57.
28. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова – М.: Медицина, 2001. – 327с.
29. Елишина В.В. Сравнительное изучение психотропной активности гетероциклических производных гаммааминомаслянной и глутаминовой кислот: Дис. канд. мед. наук / В.В. Елишина, Волгоградский гос. мед. универ. – Волгоград, 2006. – 194с.

30. Желтова А. А. Фармакологическая коррекция дисфункции эндотелия и ишемии миокарда в условиях экспериментального дефицита магния : автореферат дис. кандидата медицинских наук : 14.03.06 / Желтова Анастасия Александровна; Волгоградский гос. мед. универ. - Волгоград, 2012 - 24 с
31. Колб В.Г. Камышников В.С. Справочник по клинической химии, 2-е изд., перераб. и доп. – Минск: Беларусь, 1982. – 366 с.
32. Костычев Н.А. Влияние производных 3-гидроксипиридина на течение ишемического инсульта у белых крыс // Костычев Н.А., Коршунова А.Б./ Неврологический вестник, 2010, №4., с. 19-22
33. Котова О. В. Профилактика инсультов: неучтенные возможности // РМЖ. 2012, № 10, с. 514–517.
34. Крыжановский С. Особенности ведения пациентов в остром и восстановительном периодах после ОНМК / С. Крыжановский, М Можаровская //Врач. – 2011. – № 9. – С.37-40
35. Крохотина Л.В., Моршчакова Е.Ф.: Влияние кавинтона на систему эритронов и газовый состав крови у крыс / Эксп. клинич. фармакол. - 1994 - т.54(5) - С. 32-33.
36. Кузенков В.С., Крушинский А.Л., Реутов В.П.// Журн. Неврологии и психиатрии им. Корсакова. – 2012. - №112. – С.9-35
37. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
38. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр.мед.химии.-1990.-Т.36, № 2.- С.88-91
39. Кузенков, В. С. Влияние нитрата калия на неврологические нарушения при экспериментальной ишемии мозга / В. С. Кузенков, А. Л. Крушинский , В. П. Реутов // Вестник Московского университета. Сер. 16, Биология. - 2012. - № 4. - С. 3-6

40. Куркин Д.В. Церебропротекторные свойства композиций фенибута с некоторыми органическими кислотами при нарушениях мозгового кровообращения. Автореф. дис. канд. мед. наук. / Д.В. Куркин. М., 2013. - 28 с.
41. Ледяев М.Я. Влияние новых соединений – производных гамма-аминомасляной кислоты на агрегацию тромбоцитов и свертывание крови: Автореф. дис. канд. мед. наук. /М.Я. Ледяев. М., 1986. – 24 с.
42. Литвинов А.А Анализ последствий ишемического поражения головного мозга живот-ных, вызванного воздействием центробежного ускорения в кранио-каудальном векторе на фоне однократного введения производных γ -амино- и γ - оксимасляной кислоты./ Литвинов А.А, Куркин Д.В., Волотова Е.В.// Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. - 2012. - №4. - С. 179-183
43. Мамаев А.Н. Основы медицинской статистики. – М.: Практическая медицина, 2011. – 128с.
44. Мирзоян Р.С., Топчян А.В., Баласанян М.Г.// Фармакология мозгового кровообращения (Экспериментальное и клиническое изучение) / Под. Ред. Мирзояна Р.С.. – М., 1991. – С. 33-46
45. Нечипуренко Н.И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Мусиенко //Медицинские новости. – 2008. – №1. – С. 7-13.
46. Нефедов В.С., Тополянский В.Д., Абиндер А.А. О механизме влияния оксибутирата натрия на гемодинамику. Эксперим. хирургия и анестезиол., 1974, т.2, с.78-81.
47. Новикова Л. Я. Острые ишемические инсульты // Вестник ОКБ №1 г Екатеринбурга. 2002. - Вып. 4 - №2. - С. 39-45.
48. Осадчий, Л. И. NO-зависимый механизм адренергической реакции системной гемодинамики / Л. И. Осадчий, Т. В. Балужева, И. В. Сергеев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины: ежемесячный международный научно-теоретический журнал. - 2005. - Том140, N8. - С. 124-126.

49. Патент 2008722 Российская Федерация, МПК G09B23/28. способ моделирования травматического повреждения головного мозга / Фаращук Н.Ф., Новиков В.Е.; заявитель и патентообладатель Смоленский государственный медицинский институт - 4935720/14; заявл. 01.04.1991; опубл. 28.02.1994
50. Пирадов М.А. Нейропротекция - стратегическое направление в лечении ишемического ОНМК / М.А. Пирадов, Д.В. Сергеев //Русский медицинский журнал. – 2010. – № 8. – С.441-444
51. Плотников М.Б. Влияние оксибутирата натрия на кровоснабжение мозга в зависимости от его дозы /М.Б. Плотников, Т.П. Плотникова //Анестезиология и реаниматология.-1985.- №5.- С.33-36.
52. Принципы диагностики и лечения больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения, Методические рекомендации Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 2010
53. Путилина М.В. Комбинированная нейропротекторная терапия острых нарушений мозгового кровообращения / М.В. Путилина // Consilium medicum. – 2009. – № 2. – С.9-15
54. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Медиа Сфера, 2002. – С. 305.
55. Розанов В.А. Метаболическая роль ГАМК-шунта при экстремальных состояниях, Анестезиол и реаниматол 1989; 2: 68-78.
56. Рощина Л.Ф., Островская Р.У. Влияние пираретама на устойчивость организма к гипоксии. Фармакол. токсикол., 1981. — № 2. — 210–212.
57. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
58. Самвелян В.М. Экспериментальная терапия отека головного мозга. — Ереван, 1981
59. Сергеев А.А. Физиологические механизмы действия ускорений / А.А. Сергеев. – Ленинград: Наука, 1967. – 392с.

60. Скворцова В.И. Тромболитическая терапия при ишемическом ОНМК / В.И. Скворцова, Н.А. Шамалов // *Consilium medicum*. – 2010. – № 9. – С.29-34.
61. Скворцова В.И. Ишемический ОНМК у больных молодого возраста / В.И. Скворцова, Е.А. Кольцова, Е.И. Кимельфельд // *Журнал неврологии и психиатрии. ОНМК*. – 2009. – № 10. – С.3-14.
62. Соловьева Э.Ю., Миронова О.П., Баранова О.А. и др. . - Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная терапия при хронической ишемии мозга. М: Журн неврол и псих, 2008; №6: 98-104.
63. Сорокожердиев В. О., Тютрин И. И., Шипаков В. Е., Овсянников Ю. А., Дадэко С. М., Рипп Е. Г., Гусев Е. В. Новый метод исследования функционального состояния системы гемостаза / Сибирский медицинский университет (Томск) // *Медицина в Кузбассе* . — 2005 . — N 7 (Спецвыпуск) . — С. 254-255 .
64. Стародубцева О.С., Бегичева С.В. Анализ заболеваемости инсультом с использованием информационных технологий. - *Фундаментальные исследования*, 2012. - №8. - С. 424 - 427.
65. Суслина З. А., Румянцева С. А., Танащян М. М., Скоромец А. А., Ключева Е. Г., Федин А. И., Коваленко А. Л., Силина Е. В., Шоломов И. И. Комплексная энергокоррекция хронической ишемии головного мозга. - *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, 2011. - №3.-с.
66. Суслина З. А. Сосудистые заболевания головного мозга. Эпидемиология. Основы профилактики / З.А. Суслина, Ю.Я. Варакин, Н.В. Верещагин// 2-е издание дополненное и переработанное. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 352 с.
67. Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности нервной системы, Л., 1972, библиогр.

68. Топчян А.В. Локальная ишемия мозга крыс, вызванная перевязкой средней мозговой артерии. / Р.С.Мирзоян, М.Г. Баласанян // Эксперим. и клин. фармакол. – 1996. – Т.59, №5. – С.62-64.
69. Тюренков И.Н. ГАМКа-рецепторы: структура и функции / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – № 10. – С.43-48.
70. Тюренков И.Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т.71. – №1. – С.49-51.
71. Тюренков И.Н. Роль ГАМК-рецепторов в развитии патологических процессов / И.Н. Тюренков, В.Н. Перфилова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – № 2. – С.47-52.
72. Тютрин И.И., Пчелинцев О.Ю., Шписман М.Н., Паршин А.Н., Шипаков В.Е. Новый способ интегративной оценки функционального состояния системы гемостаза // Клинич. лаб. диагностика. 1994. ,С. 26-27.
73. Федеральная служба государственной статистики 2013,; http://www.gks.ru/bgd/regl/b11_34/isswww.exe/stg/d01/01-86
74. Фирсов А.А. Метаболическая цитопротекторная терапия в острый период ишемического ОНМК / А.А.Фирсов, М.В. Смирнов, Т.А.Усанова // Поликлиника. – 2011. – № 1. – С.34-36.
75. Фишер М. Нейропротекция при остром ишемическом ОНМК / М. Фишер // Журнал неврологии и психиатрии. ОНМК. – 2003. – № 9. – С.41-43
76. Харитонова М. В. Фармакологическая активность некоторых неорганических солей магния [Текст] : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.00.25 / Харитонова Мария Валериевна ; Волгоград. гос. мед. ун-т. - Волгоград, 2007. - 23 с.
77. Хаунина Р.А. Фенибут – новый транквилизатор / Р.А. Хаунина, И.П. Лапин // Хим.-фарм. журнал – 1976. – № 12. – С. 125-127.

78. Чернецкий Г.А. Способы определения резистентности эритроцитов / Г.А. Чернецкий. — Минск: Наука-Белорус, 2002. — 101 с.
79. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., Резванцев М.В. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований, 3-е изд., доп. — СПб.: ВМедА, 2011. — 318с.
80. Яснецов В.В. Фармакотерапия отека головного мозга / Яснецов В.В., Новиков В.Е. — М.: ВИНТИ, 1994. — 176с.
81. Яснецов В. В.. Синтез и фармакологические свойства нового производного 3-гидроксипиридина / Яснецов В. В., Скачилова С. Я., Сернов Л. Н., Воронина Т. А., Яснецов В. В.// Химико-фармацевтический журнал. - 2012. - № 4. - С. С. 3-6
82. Яснецов В.С., Евсеев А.В., Гукасов В.М., Матюшин А.И.// Фармакология и токсикология. — 1990. - №5. — С. 45-47
83. A comprehensive global monitoring framework, including indicators, and a set of voluntary global targets for the prevention and control of noncommunicable diseases. Geneva, World Health Organization, 2012. (http://www.who.int/nmh/events/2012/discussion_paper3.pdf, accessed 17 March 2013).
84. Abramov A.Y., Duchon M.R. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 2008, 953–964.
85. Abrous, D.N.; Dunnett, S.B. Skilled paw reaching in rats: the staircase test. *Neurosci. Prot.* 3: 1-11; 1994.
86. Absalom N, Eghorn LF, Villumsen IS, Karim N, Bay T, Olsen JV, et al. $\alpha 4\beta\delta$ GABA_A receptors are high-affinity targets for γ -hydroxybutyric acid (GHB). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012;109:13404–09.
87. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Leiber AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003;9:1370–1376.

88. Andresen H, Aydin BE, Mueller A, Iwersen-Bergmann S. An overview of gamma-hydroxybutyric acid: pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxic effects, addiction, analytical methods, and interpretation of results. *Drug Test Anal.*, 2011 Sep;3(9):560-568
89. Andriamampandry C, Taleb O, Kemmel V, Humbert JP, Aunis D, Maitre M. Cloning and functional characterization of a γ -hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *Faseb J* 2007;21:885–95.
90. Antonicelli R, Olivieri F, Morichi V, Urbani E, Mais V Prevention of cardiovascular events in early menopause: a possible role for hormone replacement therapy. *Int J Cardiol.*, 2008; 130(2):140-6.
91. Anukulthanakorn K, Malaivijitnond S, Kitahashi T, Jaroenporn S, Parhar I. Molecular events during the induction of neurodegeneration and memory loss in estrogen-deficient rats., *Gen Comp Endocrinol.* 2013;181:316-323
92. Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflugers Arch*, 2010;460:965–974.
93. Attwell D., Buchan A.M., Charpak S., Lauritzen M., Macvicar B.A., Newman, E.A., Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 2010, 468, 232–243.
94. Bano, D., Young, K.W., Guerin, C.J., Lefevre, R., Rothwell, N.J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., Nicotera, P., 2005. Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120, 275–285.
95. Barañano DE, Snyder SH. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;98(20):10996-1002.
96. Barreto GE, White RE, Xu L, Palm CJ, Giffard RG Effects of heat shock protein 72 (Hsp72) on evolution of astrocyte activation following stroke in the mouse. *Exp Neurol.*, 2012 Dec; 238(2):284-96.
97. Baron JC., Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach., *Brain.* 2001 Jan;124(Pt 1):2-4.

98. Baird A.L., Meldru A., Dunnett S. The staircase test of skilled reaching in mice brain repair group, School of Biosciences, Cardiff University, UK Brain Research Bulletin volume 54 No 2 January 15, 2001.
99. Bay T, Eghorn LF, Klein AB, Wellendorph P. GHB receptor targets in the CNS: focus on high-affinity binding sites, *Biochem Pharmacol.* 2014;87(2):220-8.
100. Benavides, J., Rumigny, J. F., Bourguignon, J. J., Cash, C., Wermuth, C. G., Mandel, P., Vincendon, G., and Maitre, M. High affinity binding sites for gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. *Life Sci*, 1982, 30, 953–961
101. Bhudia SK, Cosgrove DM, Naugle RI, Rajeswaran J, Lam BK, Walton E, et al. Magnesium as a neuroprotectant in cardiac surgery: a randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* (2006) 131:853–6110
102. Bian, Q., Shi, T., Chuang, D.M., and Qian, Y. Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Res*, 2007. 1184, 270–276.
103. Brambilla R, Vigna-Taglianti F, Avanzi G, Faggiano F, Leone M. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) for mid/long term treatment of alcohol dependence: a systematic review, *Riv Psichiatr.* 2012 Jul-Aug;47(4):269-80
104. Brendan Lujan, Xiaoxuan Liu, Qi Wan, Differential roles of GluN2A- and GluN2B-containing NMDA receptors in neuronal survival and death, *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2012;4(4):211-218
105. Broos, K., Feys, H.B., De Meyer, S.F., Vanhoorelbeke, K., Deckmyn, H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 2011, 25, 155–167.
106. Castelli, M. P., Mocci, I., Langlois, X., Gommerendagger, W., Luyten, W. H., Leysen, J. E., and Gessa, G. L. Quantitative autoradiographic distribution of gamma-hydroxybutyric acid binding sites in human and monkey brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2000, 78, 91–99
107. Castro-Alvarez JF, Gutierrez-Vargas J, Darnaudéry M, Cardona-Gómez GP ROCK inhibition prevents tau hyperphosphorylation and p25/CDK5 increase after global cerebral ischemia. *Behav Neurosci.*, 2011 Jun; 125(3):465-72.

108. Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, Gass P, Riva MA, Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity, *Front Cell Neurosci.* 2014 Dec 22;8:430
109. Carter LP, Chen W, Wu H, Mehta AK, Hernandez RJ, Ticku MK, Coop A, Koek W, France CP. Comparison of the behavioral effects of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and its 4-methyl-substituted analog, gamma-hydroxyvaleric acid (GHV). *Drug Alcohol Depend.* 2005, 4;78(1):91-99;
110. Carter L. P., Koek W., France C. P. Behavioral Analyses of GHB: Receptor Mechanisms, *Pharmacol Ther.* 2009 January ; 121(1): 100–114
111. Céspedes AE, Arango CA, Cardona GP Injury markers in two models of cerebral ischemia, *Biomedica.* 2013 Apr-Jun; 33(2):292-305.
112. Céspedes-Rubio A, Jurado FW, Cardona-Gómez GP, P120 catenin/ α N-catenin are molecular targets in the neuroprotection and neuronal plasticity mediated by atorvastatin after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2010 Dec; 88(16):3621-34.
113. Chalecka-Franaszek E., Chuang, D.M. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1999, 96, 8745–8750.
114. Chang J.J, Mack W.J, Saver J.L, Sanossian N. Magnesium: potential roles in neurovascular disease. *Front Neurol.* 2014 Apr 15;5:52.
115. Chi OZ, Pollak P, Weiss HR. Effects of magnesium sulfate and nifedipine on regional cerebral blood flow during middle cerebral artery ligation in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Therap*, 1990;304:196–205.
116. Chiu C-T., Chuang D-M.. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. *Pharmacol.Ther.*, 2010, 128, 281–304.
117. Chiu C-T, Wang Z, Hunsberger JG and Chuang D-M Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: Beyond bipolar disorder, *Pharmacological Reviews* 65, 2013, 105-142.

118. Choi D.W., Koh J.Y., Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci.* 1988, 8(1):185-196.
119. Combs D. J., D'Alecy L. G. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol, *Stroke*, Vol 18, No 2, 1987
120. Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW, Haslam RR.; Australasian Collaborative Trial of Magnesium Sulphate Collaborative. Effect of magnesium sulfate given for neuroprotection before preterm birth: a randomized controlled trial. *JAMA* (2003) 290:2669–7610
121. Crunelli V, Emri Z, Leresche N. Unravelling the brain targets of γ -hydroxybutyric acid. *Curr Opin Pharmacol*, 2006;6:44–52.
122. Doll E, Wilkes J, Cook LJ, Korgenski EK, Faix RG, Yoder BA, Srivastava R, Sherwin CM, Spigarelli MG, Clark EA, Bonkowsky JL. Neonatal magnesium levels correlate with motor outcomes in premature infants: a long-term retrospective cohort study. *Front Pediatr.*, 2014, Nov 5;2:p. 120
123. Donato A.J., Morgan R.G., Walker A.E., Lesniewski L.A. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.01.021>
124. Dorhout Mees SM, Algra A, Vandertop WP, van Kooten F, Kuijsten HA, Boiten J, и др. Magnesium for aneurysmal subarachnoid haemorrhage (MASH-2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* (2012) 380:44–910
125. Duley L, Gulmezoglu AM, Henderson-Smart DJ. Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* 2003CD000025
126. Enna SJ. Extrasynaptic site of action for γ -hydroxybutyrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012;109:13142–43.

127. Fan L, Pandey SC, Cohen RS Estrogen affects levels of Bcl-2 protein and mRNA in medial amygdala of ovariectomized rats., *J Neurosci Res.* 2008 Dec; 86(16):3655-64.
128. Fengling Pu, Kenichi Mishima, Nobuaki Egashira, Katsunori Iwasaki, Tomohiro Kaneko, Tomoko Uchida, Keiichi Irie, Daisuke Ishibashi, Hajime Fujii, Kenichi Kosuna, Michihiro Fujiwara Protective effect of buckwheat polyphenols against long-lasting impairment of spatial memory associated with hippocampal neuronal damage in rats subjected to repeated cerebral ischemia, *J Pharmacol Sci*, 2004, V.94, 393 – 402
129. Fricker-Gates R.A., Smith R., Muhith J., Dunnett S.B. The Role of pretraining on skilled forelimb use in an animal model of huntington's disease brain repair group, School of Biosciences, Cardiff University, UK Cell Transplantation, Vol. 12, pp. 257–264, 2003.
130. Fukumoto T., Morinobu S., Okamoto Y., Kagaya A., Yamawaki, S. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2011, 158, 100–106.
131. Galea L.A. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents *Brain Res Rev.* 2008; 57(2):332-41.
132. Galeas T, C'ontos T, Exarhos P, Galea V, Valotasiou B. The role of magnesium (Mg) a natural calcium (Ca) antagonist in the treatment of acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 1999;9 (Suppl):102.
133. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke.* 1995 Apr;26(4):627-634
134. Gao B, Kilic E, Baumann CR, Hermann DM, Bassetti CL., Gamma-hydroxybutyrate accelerates functional recovery after focal cerebral ischemia, *Cerebrovasc Dis.* 2008;26(4):413-419

135. Gao X, Zhang H, Steinberg G, Zhao H. The Akt pathway is involved in rapid ischemic tolerance in focal ischemia in Rats. *Transl Stroke Res.* 2010;№1: 202–209.
136. Garry P.S., Ezra M., Rowland M.J., Westbrook J., Pattinson K.T. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment--from bench to bedside. *Exp Neurol.*, 2015;263:235-243
137. Gildengers AG, Butters MA, Aizenstein HJ, Marron MM, Emanuel J, Anderson SJ, Weissfeld LA, Becker JT, Lopez OL, Mulsant BH, Reynolds CF 3rd. Longer lithium exposure is associated with better white matter integrity in older adults with bipolar disorder., *Bipolar Disord.* 2014 Sep 25.
138. Ginsberg MD, Graham DI, Busto R., Regional glucose utilization and blood flow following graded forebrain ischemia in the rat: correlation with neuropathology, *Ann Neurol.* 1985 Oct;18(4):470-81
139. Gómez Lado C, Couce Pico ML, Sánchez-Salmón A, Pascual JM. Glucose transporter type 1 deficiency: a treatable neuro-metabolic disorder, *An Pediatr (Barc).* 2008 Sep;69(3):285-6.
140. Gutiérrez-Vargas,J.,Castro-Álvarez,J.F.,Velásquez-Carvajal,D.,Montañez-Velásquez,N.,Céspedes-Rubio,A., Cardona-Gómez,G.P.(2010). Rac1 activity changes are associated with neuronal pathology and spatial memory long-term recovery after global cerebral ischemia. *Neurochem.Int.* 57, 762–773.
141. Haller C., Mende M., J:F. Schuier, J:R. Schuh, H. Schrock, W. Kuschinsky, Effect of γ -hydroxybutyrate on local and global glucose metabolism in the anesthetized cat brain, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 10:493 - 498,1990.
142. Harrison NL, Simmonds MA. Quantitative studies on some antagonists of N-methyl D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 1985;84:381–391.

143. Hayashi T. Vascular endothelial growth factor: protection against brain damage with MCA occlusion in rats. In: Ischemic blood flow in brain. / T. Hayashi, Y. Itoyama, R. Abe. // Springer – 2001. P. 120-127.
144. Hopper R.A., Garthwaite J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal longterm potentiation. *J Neurosci*, 2006;26:11513–11521.
145. Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Nagayama, M., Ross, M.E., Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Neurosci.*, 1997, 17, 9157–9164.
146. IMAGES Study Group, Bradford APJ, Muir KW, Lees KR. IMAGES pilot study of intravenous magnesium in acute stroke. Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke (IMAGES) Study Investigators. Magnesium for acute stroke (IMAGES trial): randomised controlled trial. *Lancet* 2004;363:439–445.
147. Iseri LT, French JH. Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J* 1984;108:188–193.
148. Izumi Y, Roussel S, Pinard E, Seylaz J. Reduction of infarct volume by magnesium after middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 1991;11:1025–1030.
149. Jacquemyn Y, Zecic A, Van Laere D, Roelens K. The use of intravenous magnesium in non-preeclamptic pregnant women: fetal/neonatal neuroprotection. *Arch Gynecol Obstet.*, 2014, Dec 12.
150. Jeroen H. F. de Baaij , Joost G. J. Hoenderop , René J. M. Bindels Magnesium in Man: Implications for Health and Disease, *Physiological Reviews*, 2015, Vol. 95 no. 1, 1-46
151. Jianqiang Lu, Yongjun Xu, Weiwu Hu, Yuanwu Gao, Xin Ni, Hui Sheng, Yu Liu Exercise ameliorates depression-like behavior and increases hippocampal BDNF level in ovariectomized rats, *Neuroscience Letters*, 573, 2014, 13–18
152. Jope, R.S Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol.Psychiatry*, 1999, 4, 117–128.

153. Jope R.S., Yuskaitis,C.J.,and Beurel, E., Glycogen synthase kinase- 3 (GSK3):inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem.Res.* 2007, 32, 577–595.
154. Kirshenboim N., Plotkin B., Shlomo S. B., Kaidanovich-Beilin O., Eldar-Finkelman H. Lithium-mediated phosphorylation of glycogensynthasekinase-3-beta involves PI3-kinase-dependent activation of proteinkinase C-alpha. *J. Mol.Neurosci*, 2004, 24, 237–245.
155. Kiss A., Delattre A.M., Pereira S.I., Carolino R.G., Szawka R.E., Anselmo-Franci J.A., Zanata S.M., Ferraz A.C. 17 β -estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas, *Behav. Brain Res.*, 2012, 227, 100–108
156. Klein P.S., Melton D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1996,. 93, 8455–8459.
157. Kidwell C.S., Lees K.R., Muir K.W., Chen C., Davis S.M., De Silva D.A., Weir C.J., Starkman S., Alger J.R., Saver J.L.; MR IMAGES Investigators. Results of the MRI substudy of the intravenous magnesium efficacy in stroke trial. *Stroke*. 2009;40(5):1704-1709
158. Kim HJ, Hwang JJ, Behrens MM, Snider BJ, Choi DW, Koh JY. TrkB mediates BDNF-induced potentiation of neuronal necrosis in cortical culture, *Neurobiol Dis.* 2003 Oct;14(1):110-119.
159. Kolte D, Vijayaraghavan K, Khera S, Sica DA, Frishman WH. Role of magnesium in cardiovascular diseases. *Cardiol Rev.* 2014 Jul-Aug;22(4):182-92.
160. Lai T.W., Shyu W.C., Wang Y.T.,. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends Mol. Med.* №17,2011, 266–275.
161. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014 Apr;115:157-88.

162. Lampl Y, Gilad R, Geva D, Eshel Y, Sadeh M. Intravenous administration of magnesium sulfate in acute stroke: a randomized double-blind study. *Clin Neuropharmacol* (2001) 24:11–510
163. Li, Q., Li, H., Roughton, K., Wang, X., Kroemer, G., Blomgren, K. and Zhu, C., Lithium reduces apoptosis and autophagy after neonatal hypoxia-ischemia. *CellDeathDis*, 2010, 1, e56.
164. Li M, Silberberg SD, Swartz KJ Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg²⁺., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2013 Sep 3;110(36):E3455-63.
165. Liang M.H., Wendland J.R., Chuang D.M. Lithium inhibits Smad3/4 transactivation via increased CREB activity induced by enhanced PKA and Akt signaling. *Mol.Cell.Neurosci*, 2008, 37, 440–453.
166. Licht R.W. Lithium: still a major option in the management of bipolar disorder. *CNS Neurosci Ther.* 2012 Mar; 18(3):219-26.
167. Liu X.L., Li C.L., Lu W.W., Cai W.X., Zheng L.W. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res.*, 2014
168. Longstreth WT, Jr, Fahrenbruch CE, Olsufka M, Walsh TR, Copass MK, Cobb LA. Randomized clinical trial of magnesium, diazepam, or both after out-of-hospital cardiac arrest. *Neurology* (2002) 59:506–1410
169. Luca G, Vienne J, Vaucher A, Jimenez S, Tafti M., Central and Peripheral Metabolic Changes Induced by Gamma-Hydroxybutyrate. *Sleep*. 2014. 135-156.
170. Ma J., Zhang G.Y.. Lithium reduced N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A tyrosine phosphorylation and its interactions with Src and Fyn mediated by PSD- 95 in rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci.Lett* 2003,. 348, 185–189.
171. Mack WJ, Kellner CP, Sahlein DH, Ducruet AF, Kim GH, Mocco J, et al. Intraoperative magnesium infusion during carotid endarterectomy: a double-blind placebo-controlled trial. *J Neurosurg* (2009) 110:961–710

172. Macmillan V., Effects of gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone on cerebral energy metabolism during exposure and recovery from hypoxemia-oligemia, , *Stroke* 1980, 11:271-277
173. Maitre, M. The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog.Neurobiol.* 51, 337–361.,1997
174. Marinov M.B., Harbaugh K.S., Hoopes P.J., Pikus H.J., Harbaugh R.E. Neuroprotective effects of preischemia intraarterial magnesium sulfate in reversible focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg*, 1996;85:117–124.
175. Marret S, Marpeau L, Zupan-Simunek V, Eurin D, Leveque C, Hellot MF, et al. Magnesium sulphate given before very-preterm birth to protect infant brain: the randomised controlled PREMAG trial*. *BJOG* (2007) 114:310–810
176. McGraw CP, Pashayan AG, Wendel OT. Cerebral infarction in the Mongolian gerbil exacerbated by phenoxybenzamine treatment, *Stroke*. 1976; 7(5):485-488.
177. MacLellan CL, Langdon KD, Botsford A, Butt S, Corbett D. A model of persistent learned nonuse following focal ischemia in rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2013 Nov-Dec;27(9): 900-907
178. Malhi GS, Tanious M, Das P, Coulston CM, Berk M. Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. Current understanding., *CNS Drugs*. 2013 Feb; 27(2):135-153.
179. Meijer L., Flajolet M., Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *Trends Pharmacol.Sci.* 2004, 25, 471–480.
180. Michael S.Okun, Lisa A. Boothby, Richard B. Barthfield, Paul L. Doering, GHB: important clinical update, *J Pharm Pharmaceut Sci*, 4(2):167 – 175, 2001
181. Ming-Mei Wu, Ting-Ting Zhu, Peng Wang,Fang Kuang, Ding-Jun Hao, Si-Wei You, Yao-Yu Li, Dose-dependent protective effect of lithium chloride on retinal ganglion cells is interrelated with an upregulated intraretinal BDNF after optic nerve transection in adult rats, *Int J Mol Sci*. Aug 2014; 15(8): 13550–13563.

182. Montoya C.P., Campbell-Hope L.J., Pemberton K.D., Dunnett S.B. The "staircase test" a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats, *Journal of Neuroscience Methods*, 36 (1991) 219-228
183. Moreau KL, Hildreth KL, Meditz AL, Deane KD, Kohrt WM. Endothelial function is impaired across the stages of the menopause transition in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 ;97(12):4692-700
184. Mourand I, Escuret E, Héroum C, Jonquet O, Picot MC, Mercier G, Milhaud D. Feasibility of hypothermia beyond 3 weeks in severe ischemic stroke: an open pilot study using γ -hydroxybutyrate. *J Neurol Sci*. 2012 May 15;316(1-2):104-107
185. Nciri R, Desmoulin F, Allagui MS, Murat JC, Feki AE, Vincent C, Croute F. Neuroprotective effects of chronic exposure of SH-SY5Y to low lithium concentration involve glycolysis stimulation, extracellular pyruvate accumulation and resistance to oxidative stress. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16:365–376.
186. Nonaka,S., Chuang D.M.. Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats, *Neuroreport*, №9, 1998, 2081–2084.
187. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984;307:462–465.
188. Oganov RG, Timofeeva TN, Koltunov IE, Konstantinov VV, Balanova YA, et al. (2011) Arterial hypertension epidemiology in Russia: the results of 2003–2010 federal monitoring. *Cardiovasc Ther Prev* 10: 9–13.
189. Ostojić ZS, Ilić TV, Vesković SM, Andjus PR. GABAB receptors as a common target for hypothermia and spike and wave seizures: intersecting mechanisms of thermoregulation and absence epilepsy. *Neuroscience*. 2013 May 15;238:39-58.
190. Ottani A, Saltini S, Bartiromo M, Zaffe D, Renzo Botticelli A, Ferrari A, Bertolini A, Genedani S., Effect of late treatment with gamma-hydroxybutyrate on the histological and behavioral consequences of transient brain ischemia in the rat, *Brain Res*. 2003 Oct 3;986(1-2):181-90

191. Park J., Omi N. The effects of different exercise modes for preventing endothelial dysfunction of arteries and bone loss in ovariectomized rats *J Exerc Nutrition Biochem.* 2014;18(2):133-139
192. Peeling J, Corbett D, Del Bigio MR, Hudzik TJ, Campbell TM, Palmer GC. Rat middle cerebral artery occlusion: correlations between histopathology, T2-weighted magnetic resonance imaging, and behavioral indices. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2001;10(4):166-177.
193. Piknova B., Kocharyan A., Schechter A.N., Silva A.C. The role of nitrite in neurovascular coupling. *Brain Res.*, 2011, 1407, 62–68.
194. Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. *Front Cell Neurosci.* 2014 Aug 14;8:231
195. Posada-Duque RA, Velasquez-Carvajal D, Eckert GP, Cardona-Gomez GP. Atorvastatin requires geranylgeranyl transferase-I and Rac1 activation to exert neuronal protection and induce plasticity. *Neurochem Int.* 2013 Mar; 62(4):433-45.
196. Preeti Sahota, Sean I. Savitz Investigational Therapies for Ischemic Stroke: Neuroprotection and Neurorecovery. *Neurotherapeutics*, 2011. - №8. - p.434–451
197. Qiu, J., Tan, Y.W., Hagenston, A.M., Martel, M.A., Kneisel, N., Skehel, P.A., Wyllie, D.J., Bading, H., Hardingham, G.E., 2013. Mitochondrial calcium uniporter (MCU) controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nat. Commun.* 4, 2034.
198. Ren M., Senatorov, V. V., Chen, R. W., and Chuang, D.M. Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2003,100, 6210–6215.
199. Rybakowski JK. Factors associated with lithium efficacy in bipolar disorder., *Harv Rev Psychiatry.* 2014 Nov-Dec;22(6):353-257
200. Riadh Nciri, M.D., Ezzeddine Bouroгаа, Samira Jbahi, Mohamed Salah Al-lagui, Abdelfattah Elfeki, Christian Vincent, Françoise Croute Chronic neuroprotective effects of low concentration lithium on SH-SY5Y cells: possible involve-

ment of stress proteins and gene expression *Neural Regen Res.* Apr 1, 2014; 9(7): 735–740.

201. Rupasinghe J., Jasinarachchi M., Progressive encephalopathy with cerebral oedema and infarctions associated with valproate and diazepam overdose. *J. Clin. Neurosci.* 2001, 18, 710-711

202. Sabbatini P, Wellendorph P, Høg S, Pedersen MHF, Brauner-Osborne H, Martiny L, et al. Design, synthesis and in vitro pharmacology of new radiolabelled GHB analogues including photolabile analogues with irreversible binding to the high-affinity GHB binding sites. *J Med Chem* 2010;53:6506–10.

203. Sadasivan S, Maher TJ, Quang LS., *Ann N Y Acad Sci.*, Gamma-Hydroxybutyrate (GHB), gamma-butyrolactone (GBL), and 1,4-butanediol (1,4-BD) reduce the volume of cerebral infarction in rodent transient middle cerebral artery occlusion, 2010, Aug;1074:537-44

204. Sasaki C., Hayashi T., Zhang W.R., Warita H., Manabe Y., Sakai K., Abe K.. Different expression of glycogen synthase kinase- 3-beta between young and old rat brains after transient middle cerebral artery occlusion *.Neurol.Res.* 2001, 23, 588–592.

205. Saver JL, Kidwell C, Eckstein M, Starkman S. Prehospital neuroprotective therapy for acute stroke: results of the field administration of stroke therapy-magnesium (FAST-MAG) pilot trial. *Stroke* 2004;35:e106–e108.

206. Santos MV, Pagnussat AS, Mestriner RG, Netto CA. Motor skill training promotes sensorimotor recovery and increases microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunoreactivity in the motor cortex after intracerebral hemorrhage in the rat. *ISRN Neurol.* 2013 Jul 15;2013:159-184

207. Schallert T., Woodlee M.T., Fleming S.M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In: Kriegstein J, Klumpp S, editors. *Pharmacology of cerebral ischemia* 2002. Stuttgart: Medpharm scientific publishers; 201-216.

208. Sharma N, Cho DH, Kim SY, Bhattarai JP, Hwang PH, Han SK Magnesium sulfate suppresses L-type calcium currents on the basilar artery smooth muscle cells in rabbits. *Neurol Res.* 2012 Apr; 34(3):291-6.
209. Schuman, E.M., Madison, D.V., Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 1994, 17, 153–183.
210. Silachev DN, Shubina MI, Iankauskas SS, Mkrtchian VP, Manskikh VN, Guliaev MV, Zorov DB. Evaluation of a long-term sensomotor deficit after neonatal rat brain ischemia/hypoxia, *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.* 2013 May-Jun;63(3):405-416
211. Smith DAS, Connick JH, Stone TW. Effect of changing extracellular levels of magnesium on spontaneous activity and glutamate release in the mouse neocortical slice. *Br J Pharmacol*, 1989;97: 475–482.
212. Sidhu, R.S., DelBigio, M.R., Tuor, U.I., and Seshia, S.S., Low-dose vigabatrin (gamma-vinyl GABA)-induced damage in the immature rat brain. *Exp. Neurol*, 1997, 144, 400–405
213. Srivastava K., Bath P.M., Bayraktutan U. Current therapeutic strategies to mitigate the eNOS dysfunction in ischaemic stroke. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2012, 32, 319–336.
214. Szydlowska K, Tymianski M Calcium, ischemia and excitotoxicity *Cell Calcium.* 2010 Feb; 47(2):122-9.
215. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; №1:61-69.
216. The Field Administration of Stroke Therapy–magnesium phase 3 clinical trial. 2008. Available at: www.fastmag.info. Accessed on 11/4/2010.
217. Toda, N., Okamura, T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol. Rev.* 2003, №55, 271–324.

218. Ted Weita Lai, Shu Zhang, Yu Tian Wang Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection, *Progress in Neurobiology*, №115, 2014, 157–188
219. Tetsuya Takahashi, Gary K. Steinberg, Heng Zhao Lithium treatment reduces brain injury induced by focal ischemia with partial reperfusion and the protective mechanisms dispute the importance of Akt activity *Aging Dis.* Jun 2012; 3(3): 226–233.
220. The Field Administration of Stroke Therapy–magnesium phase 3 clinical trial. 2008. Available at: www.fastmag.info. Accessed on 11/4/2010
221. Tisdall, M.M., Rejdak, K., Kitchen, N.D., Smith, M., Petzold, A. The prognostic value of brain extracellular fluid nitric oxide metabolites after traumatic brain injury. *Neurocrit. care.* 2013, 19, 65–68.
222. Tiziana Cesetti , Francesca Ciccolini, YutingLi GABA not only a neurotransmitter: osmotic regulation by GABAAR signaling, *Frontiers in cellular neuroscience*, 2012, V.6
223. Toda, N., Ayajiki, K., Okamura, T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol. Rev.* 2009, 61, 62–97.
224. Ueki Y., Effects of gamma-hydroxybutyrate on monoamine metabolism and protein synthesis after transient global cerebral ischemia *No Shinkei Geka*, 1992 Sep;20(9):937-946
225. Umemura S, Yoshida T, Iwayama K, Mabe H, Nagai H., Experimental study of ischemic rat brain--correlation of pathological findings with rCBF, *No To Shinkei.* 1982 Feb;34(2):179-85.
226. Van Nieuwenhuijzen PS, McGregor IS, Hunt GE. The distribution of gamma-hydroxybutyrate-induced Fos expression in rat brain: comparison with baclofen. *Neuroscience* 2009;158:441–55.
227. Vayer P, Maitre M, Gamma-hydroxybutyrate stimulation of the formation of cyclic GMP and inositol phosphates in rat hippocampal slices, *J Neurochem.* 1989 May;52(5):1382-7

228. Vergoni AV, Ottani A, Botticelli AR, Zaffe D, Guano L, Loche A, Genedani S, Gessa GL, Bertolini A. Neuroprotective effect of gamma-hydroxybutyrate in transient global cerebral ischemia in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2000 May 26;397(1):75-84.
229. Victoria E O'Collins, Malcolm R Macleod, Susan F Cox, Leena et al. Pre-clinical drug evaluation for combination therapy in acute stroke using systematic review, meta-analysis, and subsequent experimental testing, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2011) 31, 962–975
230. Vijay N, Morris M.E Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain *Curr Pharm Des.* 2014;20(10):1487-98.
231. Walf A.A., Frye C.A. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior , *Neuropsychopharmacology*, 2006, №31, 1097–1111
232. Weisz DE, Shivananda S, Asztalos E, Yee W, Synnes A, Lee SK, Shah PS; Canadian Neonatal Network. Intrapartum magnesium sulfate and need for intensive delivery room resuscitation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015 Jan;100(1):F59-65
233. Wellendorph P, Høg S, Sabbatini P, Pedersen MH, Martiny L, Knudsen GM, et al. Novel radioiodinated GHB analogues for radiolabeling and photolinking of high-affinity GHB binding sites. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335:458–64.
234. Wendt G, Kemmel V, Patte-Mensah C, Uring-Lambert B, Eckert A, Schmitt MJ, Mensah-Nyagan AG. Gamma-hydroxybutyrate, acting through an anti-apoptotic mechanism, protects native and amyloid-precursor-protein-transfected neuroblastoma cells against oxidative stress-induced death. *Neuroscience.* 2014 Mar 28;263:203-15.
235. Westermaier T, Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Dose finding study of intravenous magnesium sulphate in transient focal cerebral ischemia in rats. *Acta Neurochir. (Wien.)*, 2005;147:525–532.

236. Witlin AG, Sibai BM. Magnesium sulfate therapy in preeclampsia and eclampsia. *Obstet. Gynecol.*, 1998; 92:883–889.
237. Wong GK, Poon WS, Chan MT, Boet R, Gin T, Ng SC, и др. Intravenous magnesium sulphate for aneurysmal subarachnoid hemorrhage (IMASH): a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multicenter phase III trial. *Stroke*, 2010 41:921–610
238. Woo N. H., Lu B. Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders. *Neuroscientist*, 2006, 12, 43–56.
239. Wu W.W., Bryant D.N., Dorsa D.M., Adelman J.P., Maylie J. Ovarian hormone loss impairs excitatory synaptic transmission at hippocampal CA3-CA1 synapses. *J Neurosci*. 2013; 33(41):16158-16169.
240. Xie C, Zhou K, Wang X, Blomgren K, Zhu C. Therapeutic benefits of delayed lithium administration in the neonatal rat after cerebral hypoxia-ischemia. *PLoS One.*, 2014 ;9(9):107-192
241. Xu J., Culman J., Blume A., Brecht S., and Gohlke P. Chronic treatment with a low dose of lithium protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke* 34, .2003, 1287–1292.
242. Yamamoto M., Shina T., Vozumi T., Sogabe T., Yamada K., Kawasaki T. A possible role of a lipid peroxidation in cellular damage, caused by cerebral ischemia and the protective effect of α -tocopherol administration. *Stroke.*, 1983, №14, 977-982
243. Yang Y, Li Q, Ahmad F, Shuaib A. Survival and histological evaluation of therapeutic window of post-ischemia treatment with magnesium sulfate in embolic stroke model of rat. , 2000, 285(2):119-122.