

На правах рукописи

ЕФРЕМОВ
Борис Евгеньевич

**ФАРМАКОДИНАМИКА НИТРОКСИДОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ**

14. 00. 25 — фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Челябинск
2000

Работа выполнена на кафедре фармакологии
Челябинской государственной медицинской академии

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор **В. И. Ратников**

Научный консультант:

заслуженный работник
Высшей школы РФ,
доктор медицинских наук,
профессор **Ю. С. Шамуров**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор **Л. П. Ларионов**

доктор медицинских наук,
профессор **Х. М. Насыров**

Ведущая организация:

Научно-исследовательский инсти-
тут фармакологии РАМН

Защита состоится 19 апреля 2000 года в ___ часов
на заседании Диссертационного совета Д 08404.02
при Челябинской государственной медицинской академии
по адресу: 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЧГМА

Автореферат разослан «___» _____ 2000 года

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

А. В. Зурочка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Полученные в последние годы многочисленные данные, свидетельствующие о функционировании в организме ранее неизвестной биорегуляторной системы, в которой важнейшим звеном является оксид азота (NO), инициировали проведение огромного количества исследований по различным направлениям указанной проблемы (Palmer M. R. J., Ferrige A. G., Moncada S., 1987; Palmer M. R. J. et al., 1988; Bredt D. S., Snyder S. H., 1992; Dawson T. M., Snyder S. H., 1994; Furchgott R. F., 1996; Башкагова В. Г., Раевский К. С., 1998; Ванин А. Ф., 1998; Реутов В. П., Сорокина Е. Г., 1998).

Актуальность исследования роли NO при патологии ЦНС обусловлена тем, что многие исследователи связывают явления нейротоксичности именно с повышением уровня оксида азота в организме (Garthwaite J., Charles S. J., Chess-William R., 1988; Раевский К. С., 1997). По мнению ряда авторов (Koprowski H. et al., 1993; Cross A. H. et al., 1994; Zhang J. et al., 1994; Schmidt H. H. N. W., Walter U., 1994; Akaike T. et al., 1995), важным звеном патогенеза демиелинизирующих состояний является индукция NO-синтазы мононуклеарными клетками, что может быть основой для возникновения повреждений миелиновых волокон в головном мозгу больных, в частности рассеянным склерозом (Bo L. et al., 1994; Brenner T. et al., 1997) и спинном мозгу лабораторных животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом (Okida Y. et al., 1995).

Несмотря на определенные достижения в изучении патогенеза экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, остаются малоразработанными фармакологические аспекты указанной проблемы. В частности, не решен вопрос о характере и направленности возможного действия нит-

роксида регулирующих фармакологических препаратов при данной патологии. Так, отсутствует единая точка зрения о целесообразности применения с целью коррекции фармакологических агентов с антинитроксидазной активностью или, наоборот, веществ, усиливающих продукцию оксида азота.

Кроме того, актуальным является поиск новых фармакологических веществ, эффективно воздействующих как на образование в организме оксида азота так и на течение NO-опосредованных патологических процессов. Актуальность настоящей работы обусловлена также обоснованием новых вариантов комбинирования иммунодепрессивных средств из группы алкилирующих агентов и глюкокортикоидов (Brandt A. et al., 1993; McCombe P. A., 1996; Nguyen K. B. et al., 1997; Burt R. K. et al., 1998) с веществами, которые позволили бы существенно снизить дозы указанных высокотоксичных соединений при сохранении их корректирующего влияния на продукцию эндогенного оксида азота.

Цель работы. Изучение влияния ряда фармакологических веществ на продукцию эндогенного оксида азота при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите и разработка путей фармакологической коррекции нитроксидазных нарушений при данной патологии.

Основные задачи работы заключались в следующем:

1. Исследовать динамику суммарных уровней конечных стабильных метаболитов оксида азота в различные сроки развития экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ).
2. Провести анализ влияния ингибиторов нитроксидазных процессов на клинические проявления моделируемого демиелинизируемого состояния.

3. Выяснить возможность фармакологической коррекции экспериментального аллергического энцефаломиелита веществами с антинитроксидазной активностью.

4. Исследовать возможности оптимизации протективного действия иммунодепрессантов и глюкокортикоидов веществами с антинитроксидазной активностью при ЭАЭ

Научная новизна. Новыми являются полученные данные о характере сдвигов в продукции эндогенного оксида азота при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите. Впервые получены сведения о динамике уровней нитритов и нитратов в крови и экскреции указанных метаболитов с мочой в различные периоды моделируемого состояния. Получены новые данные, указывающие на зависимость нейропатологических проявлений ЭАЭ от направленности нитроксидазных воздействий. Сформированы теоретические предпосылки и обоснован новый принцип фармакологической коррекции демиелинизирующего патологического процесса.

Теоретическое значение работы заключается в разработке принципов фармакологической коррекции нитроксидазных процессов при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите.

Практическая ценность работы заключается в том, что установлена взаимосвязь между повышением суммарного уровня нитритов и нитратов в крови и экскрецией данных метаболитов с мочой, с одной стороны, и, с другой стороны, нейропатологическими проявлениями ЭАЭ, что обосновывает целесообразность практического использования веществ с нитроксидазной активностью для фармакологической коррекции демиелинизирующих состояний.

Положения выносимые на защиту:

1. При ЭАЭ активируется продукция оксида азота, что позволяет использовать показатели суммарных уровней его стабильных метаболитов в крови и повышение их экскреции с мочой в качестве маркеров развития демиелинизирующей патологии.

2. Использование веществ с антинитроксидазным действием в ранние сроки развития экспериментального аллергического энцефаломиелита позволяет предотвратить его развитие или значительно снижают тяжесть данной патологии у лабораторных животных.

3. Применение веществ с антинитроксидазной активностью обеспечивает оптимизацию протективного действия иммунодепрессантов и глюкокортикоидов при ЭАЭ.

Апробация работы. Основные положения работы доложены на V и VI Российских национальных конгрессах «Человек и лекарство» (Москва, 1998 и 1999), на XXXI научно-практической конференции «Современные проблемы медицины и биологии», посвященной 80-летию со дня рождения профессора Я. Д. Витебского и 25-летию проблемной научно-исследовательской лаборатории хирургической гастроэнтерологии Тюменской медицинской академии (Курган, 1999), а также на заседаниях кафедры фармакологии Челябинской государственной медицинской академии (1999).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения и выводов. Указатель литературы содержит наименования 242

отечественных и зарубежных источников Диссертация иллюстрирована 12 рисунками и 7 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на белых крысах массой 200 — 220 г. Лабораторные животные содержались в пластиковых клетках в стандартных условиях вивария на обычном питьевом рационе при свободном доступе к воде. Опытные и контрольные группы находились в строго идентичных условиях. Перед проведением эксперимента все крысы выдерживались в карантине продолжительностью не менее 20 дней.

В качестве адекватной модели рассеянного склероза был использован экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), который воспроизводился на разнополых крысах методом однократной инокуляции 20% взвеси спинного мозга здоровых крыс с полным адьювантом Фрейнда в подушечки лап (Марков Д. А., 1969; Пашков А. В., 1996).

В ходе эксперимента наблюдались характерные нейропатологические проявления ЭАЭ: снижение двигательной активности, реакции на болевое раздражение, падение веса, атаксия, парезы и параплегии, тетрапарезы и тетраплегии, парезы и параличи сфинктеров, что достоверно свидетельствовало о множественных уровнях поражения нервной системы.

Оценка результатов производилась на основании учета числа животных с неврологическими проявлениями и летальными исходами. Ежедневно с первых по шестидесятые сутки после инокуляции гомогената мозговой ткани проводилась оценка состояния лабораторных животных по методике, предложенной D. C. Ноорег с соавт. (1998). При этом выражен-

ность неврологической симптоматики и тяжесть общего состояния оценивалась по 8-бальной шкале дважды в сутки. Так, минимальное число баллов (0) характеризовало здоровое животное, у которого отсутствуют какие-либо нейропатологические проявления ЭАЭ. Первым клиническим признаком развития экспериментального аллергического энцефаломиелиита у лабораторных животных была слабость хвоста (снижение тонуса) — 1 балл (Scott G. S. et al., 1995; Brenner T. et al., 1997; Hooper D. S. et al., 1997; Hooper D. S. et al., 1998). У большинства животных нейропатологические проявления изначально были более тяжёлыми: паралич хвоста (2 балла) или паралич хвоста, сопровождающийся явлениями пареза задних конечностей (3 балла). Визуально оценивались показатели тяжести состояния, а именно паралич хвоста и частичный паралич задних конечностей (4 балла) или полный паралич задних конечностей (5 баллов).

На 15, 30, 45 и 60-е сутки после инокуляции гомогената мозговой ткани производили забой (декапитацию) крыс и определяли в крови уровень конечных метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов).

Используя метод, описанный L. C. Green с соавт. (1982), нитраты количественно определяли после восстановления их губчатим кадмием в нитриты. Концентрацию нитритов рассчитывали по градуировочному графику, построенному с использованием различных концентраций натрия нитрита, путем фотоколориметрирования при длине волны 540 нм.

Кроме оценки степени нитроксидемии при изучении роли оксида азота в генезе нарушений демиелинизирующей патологии проводили исследование экскреции конечных метаболитов молекулы указанного радикала с мочой.

Для оценки содержания нитритов и нитратов в суточной моче лабораторные животные содержались в течение суток в обменных клетках. В

собранной моче определяли указанные метаболиты по методу Н. Л. Емченко с соавт. (1994). Вследствие значительных колебаний объема собранной мочи, суммарное содержание нитритов и нитратов рассчитывали относительно концентрации креатинина в моче, определяемого в соответствии с общепринятой методикой, описанной В. В. Меньшиковым (1987).

Для морфологической верификации ЭАЭ использована методика Шпильмейера в модификации Соколянского (1978), позволяющая выявить дефекты миелиновых оболочек центральных нервных волокон у животных.

В опытах по фармакологической модуляции нитроксидергических процессов при ЭАЭ использованы следующие вещества: циклофосамид (300, 150 и 120 мг/кг/сут), дексаметазон (4, 2 и 1,6 мг/кг/сут), являющиеся иммунодепрессантами; адамантангидроксамовая кислота (АГК) — новое производное адамантана. Особенностью АГК является содержание в её составе химических групп, которые могут образовывать комплексные соединения с ионами железа. Препарат вводили в дозе 5 мг/кг/сут. Метилевый синий, блокирующий гуанилатциклазу и ингибирующий NO-синтазу применяли в дозе 1 мг/кг/сут. Мочевая кислота, играющая роль скавенджера для пероксинитрита использовалась в дозировке 500 мг/кг/сут. Указанные вещества вводили внутрибрюшинно по единой схеме с 5 по 15 сутки после инокуляции крысам гомогената мозговой ткани.

Цифровой материал подвергнут статистической обработке с вычислением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$), критерия Стьюдента (t), достоверности различий (p) (Урбах В. Ю., 1975), с использованием компьютерных программ обработки данных (Microsoft Excel 97).

Результаты исследования и их обсуждение. При воспроизведении ЭАЭ отмечено наличие характерного латентного периода длительностью в среднем $13,8 \pm 0,75$ суток и периода отчетливых неврологических проявлений средней продолжительностью $52,1 \pm 0,90$ суток. Гистоморфологические изменения при ЭАЭ (окраска по методу Шпильмейера) характеризовались очаговой демиелинизацией белого и серого вещества спинного мозга на фоне их диффузного поражения. Преимущественно очаги демиелинизации были обнаружены в белом веществе спинного мозга лабораторных животных.

Нейропатологические проявления экспериментального аллергического энцефаломиелита характеризовались значительным полиморфизмом. Присутствие в клинической картине ЭАЭ парезов и параличей передних и задних конечностей различной степени выраженности, паразезов, тетрапарезов, тетраплегий, парезов и параличей сфинктеров, расстройств чувствительности и явлений атаксии свидетельствовало о множественных уровнях поражений нервной системы и соответствовало описанным в литературе характеристикам ЭАЭ (Черниговская Н. В с соавт., 1990; Baner J. et al., 1994, Гусев Е. И. с соавт., 1997).

Максимальная выраженность патофизиологической симптоматики отмечалась на $27,5 \pm 0,72$ сутки после инокуляции гомогената мозговой ткани. К 30 суткам от начала опыта у 47 (94 %) крыс наблюдались нейропатологические нарушения, а 21 животное погибло. Таким образом, средняя продолжительность жизни погибших животных с ЭАЭ составила $23,2 \pm 0,81$ суток.

Проведенный анализ динамики уровня конечных метаболитов оксида азота в крови выявил максимальное его повышение на 30 сутки (в среднем в 3 раза выше уровня конечных метаболитов оксида азота у интактных

животных). За период с 15 по 30 сутки прирост содержания NOx составил в среднем 212 % (табл. 1).

Таблица 1

Содержание нитритов и нитратов в крови лабораторных животных

Группы животных	Серии опытов	n	Уровень NOx в крови, мкмоль/л			
			15 сутки	30 сутки	45 сутки	60 сутки
Интактные животные	1	25	19,6±1,95	20,6±2,74	21,4±2,86	22,1±2,14
Животные с ЭАЭ	2	28	37,1±1,73 P ₂₋₁ < 0,01	64,1±2,03 P ₂₋₁ < 0,001	36,3±1,06 P ₂₋₁ < 0,001	28,5±2,07 P ₂₋₁ < 0,01

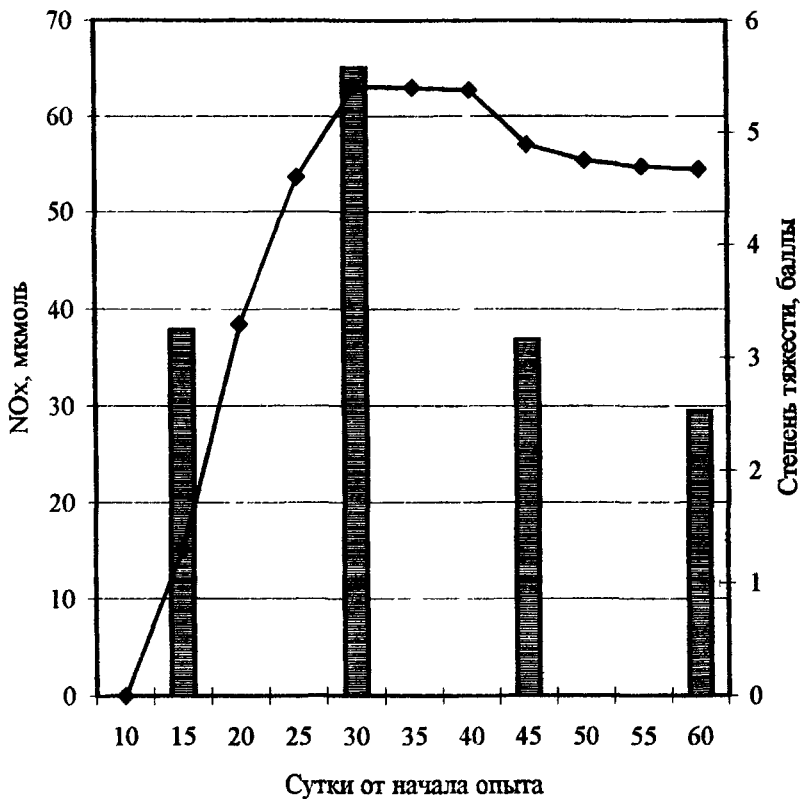
Примечание Здесь и далее NOx — суммарный показатель нитритов и нитратов, P₂₋₁ — степень достоверности различия между показателями во 2-й и 1-й сериях.

Исследование концентрации конечных метаболитов NO в крови лабораторных животных с ЭАЭ на 45 сутки после начала опыта выявило статистически достоверное снижение их уровня в среднем в 1,7 раза. В последующем данный показатель, отражающий продукцию эндогенного оксида азота, постепенно снижался, оставаясь к 60 суткам незначительно повышенным относительно контроля.

В ходе наблюдений установлен параллелизм между повышением уровня нитроксидергических соединений в крови и суточной моче лабораторных животных с выраженностью характерных нейропатологических проявлений ЭАЭ. Так, нарастание клинических проявлений ЭАЭ сопровождалось статистически значимым повышением суммарного уровня нитри-

тов и нитратов в крови и суточной моче (рис. 1). Максимальная летальность в этой группе лабораторных животных регистрировалась к 30 суткам от начала исследования, когда отмечались максимальные уровни NOx в крови и суточной моче животных ($64,1 \pm 2,03$ мкмоль/л и $99,3 \pm 7,18$ мкмоль/миллимоль соответственно) Признаком утяжеления течения экспериментального аллергического энцефалита явилась и выраженность клинических проявлений заболевания, достигшая максимума к 30 суткам от начала опыта, когда отмечался наиболее высокий уровень конечных метаболитов оксида азота в крови и суточной моче лабораторных животных.

Возможно, разрушение миелина нервных волокон при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите связано с воспалением и инфильтрацией ткани мозга макрофагами и Т-лимфоцитами из крови (Гусев Е. В. с соавт., 1997). Последние в свою очередь, вырабатывают большое количество активационных цитокинов (ИЛ-1бета, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ОНФ-альфа) (Deng M. et al., 1998) и способствуют выделению эндогенных медиаторов воспаления: гистамин, простагландины, лейкотриены, оксид азота (Saito S. et al., 1996; Kundu N et al., 1998). Известно, что экспрессия индуцибельной NO синтазы в значительной степени регулируется указанными биологически активными веществами и обуславливает генерацию огромного количества оксида азота (Chester A. et al., 1998). Накопление указанного свободного радикала в ЦНС способствует развитию процессов альтерации и демиелинизации в нервной ткани (Feinstein D. I., Apatoff V. R., 1995; Hooper D. C. et al., 1997). Таким образом, результаты наших исследований показали, что развитие экспериментального аллергического энцефаломиелита сопровождается повышением суммарного





 Суммарный уровень нитритов и нитратов в плазме крови лабораторных животных, мкмоль/л
 степень тяжести, баллы

Рис. 1. Динамика суммарного уровня нитритов и нитратов в плазме крови (NO_x) и выраженности неврологических проявлений у лабораторных животных с ЭАЭ

уровня нитритов и нитратов в крови и суточной моче лабораторных животных. Установлены сроки развития наиболее выраженных изменений в системе нитроксидазических показателей. Так, на 30-е сутки регистрировалась значительная гипернитроксидазия, которая уменьшалась на 45 сутки от начала моделирования патологического процесса и практически нивелировалась к 60-м суткам эксперимента.

После выявления основных закономерностей течения экспериментального аллергического энцефаломиелита, установления их связи с показателями обмена оксида азота была поставлена задача изучения влияния на выявленные изменения препаратов с антинитроксидазической активностью. Последнее достигалось путем введения экспериментальным животным в период с 5 по 15 сутки от начала опытов экзогенных ингибиторов или скавенджеров оксида азота.

Установлено, что вещества с антинитроксидазическим действием вызывали достоверное увеличение латентного периода при ЭАЭ (табл. 2). В этих сериях экспериментов наиболее выраженные эффекты зарегистрированы при применении мочевой кислоты и дексаметазона. Однако применение и других веществ с антинитроксидазической активностью в указанные выше сроки увеличивало латентный период в среднем на 25 %. Лишь введение метиленового синего не сопровождалось статистически значимым пролонгированием латентного периода.

В ходе работы выяснено, что антинитроксидазические препараты снижали в результате их применения суммарное содержание нитритов и нитратов в крови крыс с ЭАЭ. Указанное снижение было выражено практически в одинаковой степени во всех экспериментальных группах. Регистрируемые при этом показатели NO_x были статистически значимо ниже

Таблица 2

Влияние фармакологических ингибиторов нитроксидазических процессов на продолжительность латентного периода ЭАЭ у лабораторных животных

№№ групп	Серии опытов	n	Продолжительность латентного периода, сутки	P
1	ЭАЭ, контроль (P ₁)	50	13,8±0,75	—
2	ЭАЭ + дексаметазон, 3 мг/кг/сутки (P ₂)	18	18,3±1,07	P ₂₋₁ < 0,05
3	ЭАЭ + циклофосфамид, 20 мг/кг/сутки (P ₃)	16	16,8±0,45	P ₃₋₁ < 0,05
4	ЭАЭ + АГК, 5 мг/кг/сутки (P ₄)	18	17,3±0,71	P ₄₋₁ < 0,05
5	ЭАЭ + метиленовый синий, 1 мг/кг/сутки (P ₅)	18	15,2±1,21	P ₅₋₁ > 0,05
6	ЭАЭ + мочевая кислота, 500 мг/кг/сутки (P ₆)	20	18,7±0,92	P ₆₋₁ < 0,01

уровня NOx, отмеченного в опытах у крыс с ЭАЭ, но без дальнейшего ингибирования нитроксидазической системы (табл. 3). В несколько меньшей степени содержание NOx уменьшалось при применении метиленового синего, хотя и в этих опытах выявлялась отчетливая тенденция к уменьшению содержания в крови нитритов и нитратов.

Таблица 3

Влияние веществ с антинитроксидазной активностью
на содержание нитритов и нитратов в крови лабораторных животных

Группы животных	Серия опытов	n	Уровень NOx в крови лабораторных животных, мкмоль/л			
			15 сутки	30 сутки	45 сутки	60 сутки
Интактные животные	1	25	19,6±1,95	20,6±2,74	21,4±2,86	22,1±2,14
Контрольные животные с ЭАЭ	2	50	37,1±1,73 P ₂₋₁ < 0,01	64,1±2,03 P ₂₋₁ < 0,001	36,3±1,06 P ₂₋₁ < 0,001	28,5±2,07 P ₂₋₁ > 0,5
ЭАЭ + дексаметазон	3	45	23,2±3,06 P ₃₋₁ > 0,5 P ₃₋₂ < 0,01	35,7±2,76 P ₃₋₁ < 0,01 P ₃₋₂ < 0,001	25,3±3,06 P ₃₋₁ > 0,5 P ₃₋₂ < 0,05	21,7±1,94 P ₃₋₁ > 0,05 P ₃₋₂ > 0,5
ЭАЭ + циклофосфамид	4	45	24,5±2,52 P ₄₋₁ > 0,5 P ₄₋₂ < 0,01	36,2±1,87 P ₄₋₁ < 0,01 P ₄₋₂ < 0,001	27,2±1,12 P ₄₋₁ > 0,5 P ₄₋₂ < 0,001	24,2±2,11 P ₄₋₁ > 0,05 P ₄₋₂ > 0,5
ЭАЭ + адамантангидроксамовая кислота	5	45	25,4±2,07 P ₅₋₁ > 0,5 P ₅₋₂ < 0,01	37,1±3,11 P ₅₋₁ < 0,01 P ₅₋₂ < 0,001	26,5±1,88 P ₅₋₁ > 0,5 P ₅₋₂ < 0,01	25,3±3,18 P ₅₋₁ > 0,5 P ₅₋₂ > 0,5
ЭАЭ + метиленовый синий	6	40	27,1±1,93 P ₆₋₁ > 0,5 P ₆₋₂ < 0,01	48,4±1,26 P ₆₋₁ < 0,001 P ₆₋₂ < 0,01	23,3±3,42 P ₆₋₁ > 0,05 P ₆₋₂ < 0,01	24,1±1,73 P ₆₋₁ > 0,5 P ₆₋₂ > 0,5
ЭАЭ + мочевиная кислота	7	45	22,3±2,07 P ₇₋₁ > 0,5 P ₇₋₂ < 0,001	38,6±1,31 P ₇₋₁ < 0,01 P ₇₋₂ < 0,001	24,5±1,93 P ₇₋₁ > 0,5 P ₇₋₂ < 0,001	25,5±1,96 P ₇₋₁ > 0,5 P ₇₋₂ > 0,5

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что вещества с антинитроксидазной активностью уменьшают в период развития ЭАЭ генерацию оксида азота в организме, что сопровождается смягчением тяжести течения моделируемого состояния. Не исключено, что снижение уровня NOx в период нейропатологических проявлений демиелинизирующей патологии может считаться прогностически благоприятным признаком течения ЭАЭ и выздоровления лабораторных животных с демиелинизирующей патологией

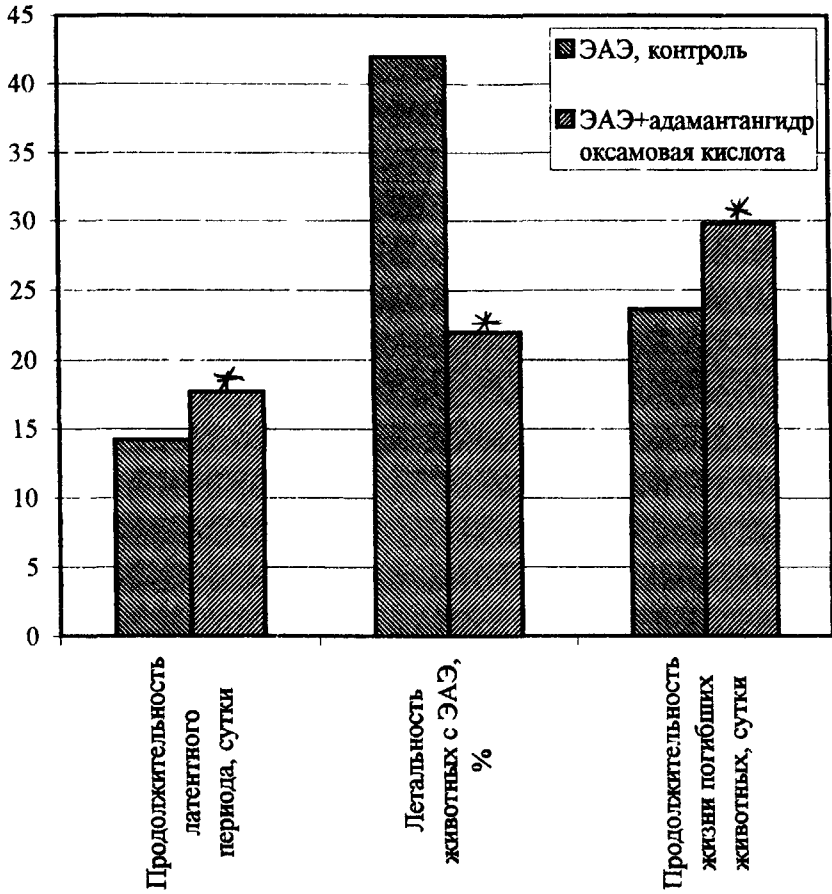
Суммарный уровень нитритов и нитратов в крови животных в период с 15 по 45 сутки, т.е. при уже развившихся проявлениях экспериментального аллергического энцефаломиелита, был статистически достоверно снижен в серии опытов с применением циклофосфида, адамантангидроксамовой кислоты, дексаметазона, метиленового синего и мочевой кислоты. Вероятно, циклофосфид и кортикостероид дексаметазон обеспечивали указанный эффект через подавление функционального состояния ряда иммунокомпетентных клеток, продуцирующих NO (Okuhara M., Kino T., 1994; Wortall N. et al., 1996). Известно также выраженное модулирующее влияние на образование эндогенного NO комплексанатов железа (Weiss G. et al., 1997; Recalcati S. et al., 1998), к которым относится новый препарат — адамантангидроксамовая кислота. Мочевая кислота является скавенджером для азота оксида, снижающим содержание как самой молекулы, так и её метаболитов в крови (Foegh M., Ramvvel P., 1997). Выявленное снижение тяжести заболевания, которое было обусловлено введением мочевой кислоты, вероятно обусловлено захватом и выведением из организма пероксинитрита — одного из наиболее активных метаболитов оксида азота, с которым часто связывают повреждающие действие NO на

ЦНС при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (Hooper D. C. et al., 1998).

Обнаруженное в проведенных исследованиях уменьшение генерации NOx в крови обусловлено, вероятно, подавлением продукции этого свободного радикала макрофагальными клетками. Установлена прямая зависимость между увеличением латентного периода ЭАЭ, смягчением тяжести его течения, снижением числа летальных случаев среди лабораторных животных с ЭАЭ, увеличением продолжительности жизни погибших животных и ослаблением нитроксидергических нарушений.

Применение нового производного адамантана адамантангидроксамовой кислоты (АГК) для ингибирования нитроксидергических процессов при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите позволило не только добиться снижения уровня конечных метаболитов азота оксида в среднем на 27 %, но и значительно смягчить проявления патологии у лабораторных животных (рис. 2). Полученные факты позволяют рассматривать адамантангидроксамовую кислоту, как препарат с выраженной антинитроксидергической активностью, обладающий протективным действием в отношении демиелинизирующей патологии.

Выявленное в настоящем исследовании и описанное выше пролонгирование латентного периода экспериментального аллергического энцефаломиелита, снижения летальности, смягчение тяжести течения ЭАЭ, увеличение продолжительности жизни погибших животных при ингибировании нитроксидергических процессов в организме крыс с моделируемой патологией обусловило целесообразность проведения экспериментов, имеющих целью изучение характера влияния исследованных препаратов на эффекты глюкокортикоидов и иммунодепрессантов. Ряд исследовате-



Примечание. Здесь и далее. * — достоверное отличие от контроля

Рис. 2. Изменение показателей течения ЭАЭ у лабораторных животных под влиянием адамтангидроксамовой кислоты

лей отмечают высокую эффективность иммуносупрессивной терапии цитостатиками и глюкокортикоидами при ЭАЭ у крыс (Nguyen K. B. et al., 1997) и мышей (Lledo A. et al., 1999). Однако использование глюкокортикоидов и иммунодепрессантов внеобходимых при этом высоких дозах нередко сопровождается различными отрицательными эффектами, связанными с высокой токсичностью лекарственных средств из указанной фармакологической группы. В связи с этим не только теоретическое, но и большое практическое значение имеют исследования, направленные на разработку эффективных способов снижения отрицательного действия данных препаратов при демиелинизирующей патологии.

На рисунке 3 видно, что применение циклофосфида привело к снижению тяжести заболевания в среднем на 29 %, а летальность в данной группе лабораторных животных уменьшилась в среднем на 21 %. При уменьшении дозы циклофосфида до 120 мг/кг эффект в отношении коррекции нейропатологических проявлений ЭАЭ не наблюдался. Однако при совместном использовании адамантангидроксамовой кислоты с этой дозой циклофосфида корригирующий эффект последнего восстанавливался. Средняя продолжительность жизни погибших животных из указанной экспериментальной группы статистически значимо не отличалась от соответствующего показателя, регистрируемого при применении одного циклофосфида, что свидетельствовало о синергизме вводимых препаратов.

Аналогичные по характеру результаты получены и при комбинации неэффективной в отношении предупреждения развития нейропатологических проявлений дозы циклофосфида с метиленовым синим, или с мочевиной (рис. 3).

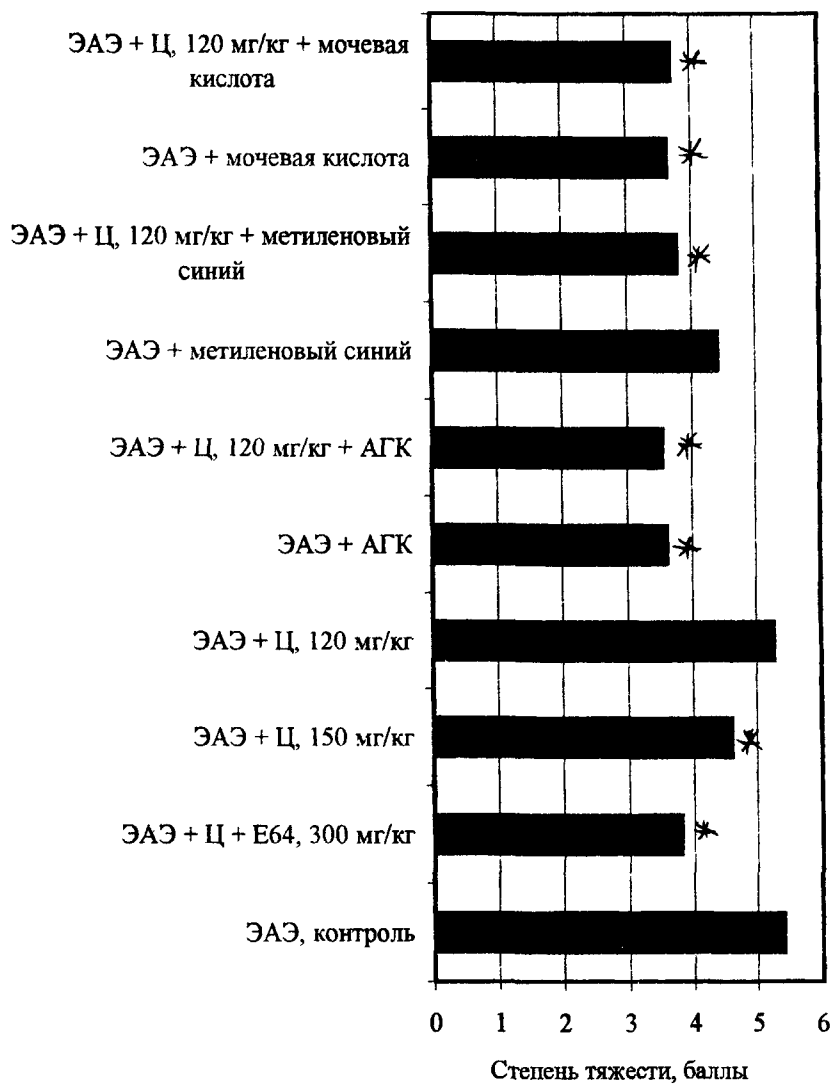


Рис. 3. Влияние веществ с антинитроксидазной активностью на протективные эффекты циклофосфида (Ц) при ЭАЭ

Установлено, что дексаметазон в дозе 4 мг/кг/сут, вводимый крысам с ЭАЭ с 5 по 15 сутки от начала опыта уменьшал нейропатологические проявления экспериментального энцефаломиелита у лабораторных животных, но при снижении его дозы до 1,6 мг/кг/сут, не наблюдалось подобного воздействия данного препарата.

На рисунке 4 видно, что комбинация изученных нами веществ с антинитроксидационными свойствами также восстанавливала корректирующее влияние низкой дозы дексаметазона.

Таким образом, установлен синергизм в действии, с одной стороны, циклофосфида или дексаметазона, а, с другой стороны, любого из исследованных нами веществ с выявленной антинитроксидационной активностью. Вследствии подобного взаимодействия веществ из сравниваемых групп удалось снизить более чем в два раза дозы изученных цитостатика и глюкокортикоида без уменьшения их протективного действия при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите. Установленный факт означает, что ингибирование продукции оксида азота или снижение эффектов NO может явиться перспективной стратегией фармакотерапии демиелинизирующих состояний.

Таким образом, при выполнении настоящего диссертационного исследования раскрыт характер влияния ряда изученных препаратов на продукцию эндогенного оксида азота и обоснована целесообразность их использования с целью коррекции нитроксидационных нарушений при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите.

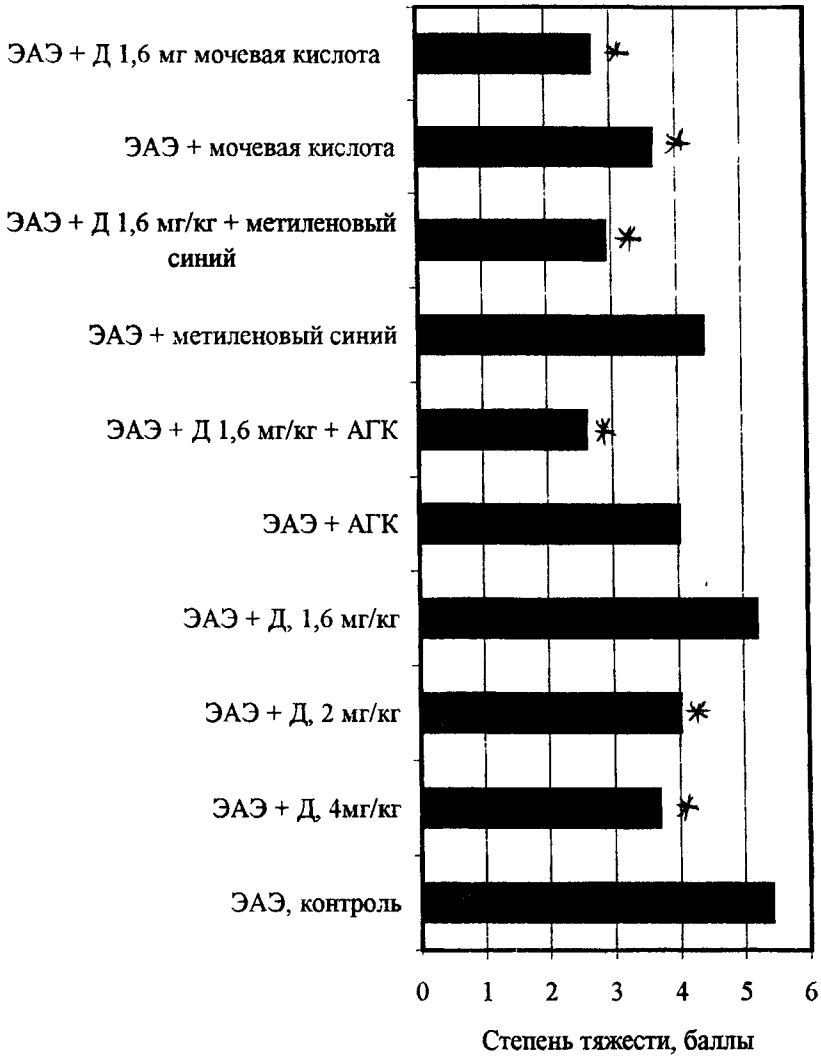


Рис.4. Влияние веществ с антинитроксидазной активностью на протективные эффекты дексаметазона (Д) при ЭАЭ

ВЫВОДЫ

1. Развитие экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) сопровождается транзиторным усилением продукции эндогенного свободного радикала оксида азота с зависимостью выраженности клинических проявлений моделируемой патологии от динамики накопления его стабильных метаболитов (нитраты, нитриты) в крови лабораторных животных.

2. Установленный в работе феномен усиления экскреции конечных метаболитов нитроксид-молекулы с мочой также находится в тесной связи с выраженностью нейропатологических проявлений экспериментального аллергического энцефаломиелита у лабораторных животных.

3. Ингибирование NO-зависимых процессов применением фармакологических агентов с антинитроксидагентным действием способствует увеличению продолжительности латентного периода при ЭАЭ, уменьшению выраженности его нейропатологических проявлений, снижению летальности и увеличению продолжительности жизни погибших животных.

4. Позитивный характер влияния изученных ингибиторов на нейропатологические проявления ЭАЭ обосновывает новую стратегию фармакологической коррекции демиелинизирующих процессов веществами с антинитроксидагентной активностью.

5. Показана возможность использования нового производного адмантана — адмантангидроксамовой кислоты в качестве вещества с патогенетическим антинитроксидагентным действием при ЭАЭ.

6. На фоне ингибирования нитроксидагентных процессов в организме лабораторных животных регистрируется усиление действия иммунодепрессантов и глюкокортикоидных препаратов, что позволяет снизить

дозы последних для достижения протективного эффекта при демиелинизирующей патологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Исследование возможной роли азота оксида в патогенезе экспериментального аллергического энцефаломиелита // Клиническая фармакология — практическому здравоохранению: Тезисы докладов межвузовской научно-практической конференции. — Саратов, 1998. — С. 212. (соавт. Ратников В. И.).
2. Влияние метиленового синего на развитие аутоиммунного энцефаломиелита // V Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: Тезисы докладов. — М., 1998. — С. 487. (соавт. Ратников В. И.).
3. Влияние мочевой кислоты на развитие экспериментального аллергического энцефаломиелита // VI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: Тезисы докладов. — М., 1999. — С. 29.
4. Изучение возможных путей фармакологической коррекции демиелинизирующих заболеваний на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита // XXXI научно-практическая конференция «Современные проблемы медицины и биологии», посвященная 80-летию со дня рождения профессора Я.Д. Витебского и 25-летию проблемной научно-исследовательской лаборатории хирургической гастроэнтерологии Тюменской медицинской академии: Тезисы докладов. — Курган, 1999. — С. 163. (соавт. Ратников В. И.).
5. Исследование защитного действия препаратов с антинитроксидазной активностью при демиелинизирующей патологии // Материалы

научной конференции посвященной 50-летию Центра военно-технических проблем биологической защиты МО РФ. — Екатеринбург, 1999. — С. 64-66. (соавт. Ратников В. И.).

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long tail stroke, located in the lower right quadrant of the page.

Отдел ТСО ЧГМА. 14.03.2000.
Тираж 100 экз.

РНБ Русский фонд

2005-4

39007



03 APR 2008