

ХРОНИЧЕСКАЯ СЕРДЕЧНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ И САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА: ПЕРСПЕКТИВЫ ОПТИМИЗАЦИИ ФАРМАКОТЕРАПИИ КОМОРБИДНОЙ ПАТОЛОГИИ

© Карантыш Г.В.¹, Гафиятуллина Г.Ш.², Менджерский А.М.³

¹ Южный федеральный университет (ЮФУ)

Россия, 344082, Ростовская обл., г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105/42

² Ростовский государственный медицинский университет (РостГМУ)

Россия, 344022, Ростовская обл., г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

³ Донской государственный технический университет (ДГТУ)

Россия, 344000, Ростовская обл., г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1

Цель: изучить влияние ноотропного препарата винкамина на неврологический статус, а также активность антиоксидантных ферментов и уровень экспрессии кодирующих их генов в соматосенсорной коре крыс в модели экспериментального аллергического энцефаломиелита. Актуальность изучения механизмов рассеянного склероза на ранних стадиях его развития продиктована необходимостью поиска маркеров заболевания и его терапии до начала клинической манифестации заболевания.

Материалы и методы. Неврологический статус у животных изучали с использованием тестов на мышечную силу, равновесия и цепкость-тягу, оценивали также показатели выживаемости и веса тела у крыс. Исследование активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГПО), глутатион-редуктазы (ГР), а также экспрессии генов SOD1, GPX4, GPX6 и GSR проводили на 14-й и 30-й день иммунизации.

Результаты. Процент выживаемости у животных, которым вводили винкамин, составил 100% против 87% у крыс, которые не получали ноотроп на фоне иммунизации ($p < 0,05$). При введении винкамина наблюдали менее значительное снижение веса тела ($p < 0,01$) и не столь выраженный неврологический дефицит ($p < 0,05$), относительно иммунизированных животных без введения ноотропного препарата. Активность всех изученных антиоксидантных ферментов и уровень экспрессии их генов в соматосенсорной коре при введении винкамина статически значимо повышались.

Заключение. На фоне введения ноотропа винкамина наблюдается минимизация неврологического дефицита, вероятно, благодаря снижению окислительного стресса в мозге у крыс на этапе клинической стадии экспериментального аллергического энцефаломиелита.

Ключевые слова: рассеянный склероз; винкамин; про- и антиоксидантный статус; экспрессия генов SOD1, GPX4, GPX6 и GSR в мозге.

Карантыш Галина Владимировна – д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры коррекционной педагогики, ЮФУ, г. Ростов-на-Дону. ORCID iD: 0000-0001-9130-6491. E-mail: karantysjgv@mail.ru

Гафиятуллина Гузель Шамилевна – д-р мед. наук, профессор, проректор по обучению иностранных граждан и международному сотрудничеству, профессор кафедры нормальной физиологии, РостГМУ, г. Ростов-на-Дону. ORCID iD: 0000-0002-7656-2101. E-mail: ggsh@aaanet.ru (автор, ответственный за переписку)

Менджерский Александр Маркович – д-р биол. наук, профессор, профессор кафедры биологии и общей патологии, ДГТУ, г. Ростов-на-Дону. ORCID iD: 0000-0001-5584-9763. E-mail: amendzheritskiy@mail.ru

Рассеянный склероз (РС) является хроническим аутоиммунным заболеванием, относимым вследствие своей распространенности и последствий к категории социально значимых, и сопровождается тяжелым органическим поражением центральной и периферической нервной системы в результате процесса демиелинизации [6]. К числу факторов, определяющих высокое социальное бремя заболевания, относятся существенные показатели его распространенности – 2 млн. человек в мире и около 200 тысяч в России, – и ранней инвалидизации больных, что оказывает существенную нагрузку на экономику и систему здравоохранения [4, 12].

Диагностику РС проводят на основании совокупности лабораторных и инструментальных методов: анализа локального синтеза олигоклональных антител в спинномозговой жидкости, данных МРТ и вызванных потенциалов

мозга [37], однако начинают ее уже в период клинической манифестации заболевания [16]. Его верификацию на доклинической стадии на настоящее время не проводят, вследствие чего уже спустя 3 года после первичной постановки диагноза у пациента могут сформироваться множественные очаги демиелинизации, что естественным образом снижает эффективность лечения [27]. Несмотря на многочисленные исследования, лежащие в основе анализа иммуннопатологических механизмов, определяющих развитие заболевания, – генетических, средовых, стрессорных, вирусных инфекций – его происхождение остается невыясненным. Этиологические агенты являются неоднородными, но процессы, нарушающие функционирование нейронов в результате эксайтотоксичности или воспаления, приводят к апоптозу. При этом сообщают о том, что атрофия серого вещества кор-

тикальных и подкорковых структур имеет большее диагностическое значение, чем атрофия белого вещества головного мозга, поскольку именно изменения в сером веществе в значительной степени определяют степень инвалидизации [17]. В связи с этим в данном исследовании объектом исследования явилась соматосенсорная кора экспериментальных животных.

РС считают мультифакториальным аутоиммунным заболеванием, а наиболее распространенной его экспериментальной моделью является экспериментальный аллергический энцефалит (ЭАЭ). Он наиболее полно воспроизводит каскад событий, сопровождающий формирование патологии, и в зависимости от видовой принадлежности животного проявляется как рецидивирующее/перемежающееся или прогрессирующее заболевание. При этом идентификация нарушений генных ансамблей, приводящих к РС, а также внедрение в практику скрининговых методов диагностики, сделает возможным выявление молекулярных дефектов и расширит представления об иницирующих их механизмах и предикторах.

Протекание РС характеризуется наличием воспалительно-рецидивирующей и вторично-прогрессирующей дегенеративной фазы, при этом ведущую роль в процессах демиелинизации и нейродегенерации, приводящих к манифестации склероза, играет окислительный стресс. При демиелинизации и митохондриальной дисфункции интенсифицируются свободнорадикальные процессы, индуцированные воспалением и высвобождением железа, что приводит к энергетическому дефициту и нарушению окислительного фосфорилирования [25]. Данные представления явились основой для применения у больных с РС препаратов, обладающих антиоксидантным действием [9, 15], поскольку апробированные методы лечения прогрессирующих форм заболевания крайне ограничены и подчас неэффективны [29].

Терапия РС включает назначение препаратов с нейротрофическими свойствами, а на ранних этапах заболевания – низких доз ноотропных препаратов с антиоксидантным и нейропротекторным действием, применение которых может замедлить процессы формирования когнитивных дисфункций и депрессивных расстройств, ухудшающих качество жизни больных [7]. Показано, что модификация ДНК и митохондриального генома, вызванного окислительным стрессом, может быть частично предотвращена назначением пирацетама [34]. Для последовательного формирования системного подхода, раскрытия фундаментальных механизмов развития РС, разработки инновационных методов диагностики и лечения заболева-

ния, в том числе индивидуального тестирования чувствительности и подбора наиболее эффективного лечения представляется целесообразным проведение комплексного анализа патологических изменений при РС.

Перспективным представляется изучение эффектов центрального вазодилататора винкамина в модели рассеянного склероза, поскольку показано, что препараты данного ряда активируют норадренергическую систему медиации в *Locus coeruleus*, что, как предполагают, может влиять на снижение симптоматики рассеянного склероза [30]. Также установлено, что производные винкамина оказывают нейропротективное действие [36].

Целью данной работы явилось выявление поведенческих, биохимических и молекулярных механизмов рассеянного склероза в условиях фармакологической коррекции ноотропным препаратом винкамином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты на животных выполнены с соблюдением принципов Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Исследования проведены на 3-4-месячных самках беспородных крыс весом 220-250 г. Всех животных делили на основные 3 группы: 1 – контрольная группа (n=10); 2 – моделирование ЭАЭ (n=30); 3 – введение винкамина в дозировке 20 мкг/кг с первого дня иммунизации в течение 10 суток (n=30). Использовали лекарственное средство винкамин (*Vincaminum*) с химической формулой Метил-(3-альфа,14-бета,16-альфа)-14,15-дигидро-14-гидроксиэбурнамин-14-карбоксилат в капсулах, 30 мг (*Sigma-Aldrich*, США). Препарат растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно.

Расчет дозы винкамина производили путем вычисления LD₅₀ для данного вида животных с границей доверительного интервала 95%.

Известно, что средняя продолжительность ЭАЭ у грызунов составляет 30 дней (латентная стадия – 1-7 день, клиническая стадия 7-18 дней, 19-30 день – стадия ремиссии). При этом клиническая стадия характеризуется нарастанием иммунного ответа, а неврологический дефицит развивается к концу стадии ремиссии [14]. В связи с этим исследование биохимических и молекулярных показателей проводили у животных 2-3 групп в период клинической стадии (на 14-й день иммунизации – 1 подгруппа), а также 30-й день после моделирования ЭАЭ (2 подгруппа). Таким образом, животных

2-3 групп делили на подгруппы: 1 подгруппа, у которой оценивали показатель выживаемости, вес тела, неврологический дефицит, биохимические и молекулярные показатели; 2 подгруппа, у которой изучали биохимические и молекулярные показатели (табл. 1).

Индукцию ЭАЭ проводили путем однократного подкожного введения в подушечки задних лапок смеси экстракта спинного мозга беспородных белых крыс без неврологической симптоматики с 0,2 мл полного адьюванта Фрейнда [24].

В группах иммунизированных животных оценивали показатель выживаемости, неврологический статус и вес тела, контролируемый ежедневно в утренние часы [14]. Неврологический статус оценивали с использованием балльной системы ежедневно в утренние часы. Итоговый балл, позволяющий оценить функциональное состояние экстрапирамидной системы, рассчитывали как сумму от 0 до 9 (0 баллов – максимальная выраженность нарушений; 9 – их отсутствие) в трех двигательных тестах, детерминирующих мышечную силу, цепкость-тягу и равновесие. Тест на мышечную силу проводили с использованием проволочного экрана 15х30 см, который мог совершать отклонение от горизонтального положения от 0° до 90°. Размер проволочной ячейки составлял 0,6х0,6 см. Экран располагали в вертикальной позиции на высоте 70 см от матерчатой подложки толщиной 8 см для снижения риска травматизации животного при падении с экрана. Максимальное время тестирования – 15 с. Тест на равновесие проводили с использованием деревянного стержня диа-

метром 2,5 см, который располагали на высоте 40 см от матерчатой ткани, обеспечивающей мягкое падение животного со стержня. Животное помещали на стержень и фиксировали время до падения животного. Максимальное время тестирования – 30 с. Тест на цепкость-тягу дает возможность оценить способность животного удерживаться на горизонтальной веревке передними лапами, что отражает мышечную силу, а также оценить силу мышечной тяги, что отражает способность животного подтягивать свешивающиеся задние конечности на веревку (определяет мышечную силу и координацию). Нейлоновую веревку диаметром 0,5 см располагали вертикально на высоте 70 см от матерчатой подложки. 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. Тяжесть неврологических нарушений фиксировали на видеокамеру [2, 13].

Для молекулярных и биохимических исследований мозг извлекали из черепа и немедленно замораживали в сухом льду. Область соматосенсорной коры была вырезана согласно атласу мозга крысы [28]. Активность глутатионпероксидазы в гомогенатах ткани соматосенсорной коры определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона в присутствии гидроперекиси третичного бутила по методу [18], активность глутатионредуктазы – по скорости окисления НАДФН2 методом E. Beutler [11], активность ферментов выражали в мкмоль/мин/мг белка. Активность супер-

Таблица 1

Table 1

Дизайн эксперимента. Количество животных в экспериментальных группах
(без учета показателя выживаемости)

Experiment design. Number of animals in experimental groups (excluding survival rate)

Исследуемые показатели Tested parameters	Группы Groups	Контроль Control (n=10)	ЭАЭ (n=30)		ЭАЭ+В (n=30)	
			EAE (n=30)		ЭАЭ+В (n=30)	
			ЭАЭ_14 EAE_14 (n=10)	ЭАЭ_30 EAE_30 (n=20)	ЭАЭ+В_14 EAE+V_14 (n=10)	ЭАЭ+В_30 EAE+V_30 (n=20)
Показатель выживаемости, вес тела, неврологический статус Survival rate, body weight, neurological status	+	+	-	+	-	+
Биохимические и молекулярные показатели Biochemical and molecular parameters			+	+	+	+

Примечание: здесь и далее: ЭАЭ_14 – 14 дней после иммунизации; ЭАЭ_30 – 30 дней после иммунизации; ЭАЭ+В_14 – 14 дней после введения винкамина и иммунизации; ЭАЭ+В_30 – 30 дней после введения винкамина и иммунизации.

Note: here and further: EAE – experimental allergic encephalomyelitis, EAE_14: 14 days after immunization; EAE_30: 30 days after immunization; EAE+V_14: 14 days after vincamine administration and immunization; EAE+V_30: 30 days after vincamine administration and immunization.

оксиддисмутазы определяли по интенсивности ингибирования восстановления нитросиногтетразолия при генерации супероксидного радикала в процессе окисления ксантина ксантиноксидазой при длине волны 560 нм и выражали в $\Delta E560/\text{мг}$ белка [1].

В соматосенсорной коре мозга также проводили оценку уровня экспрессии генов антиоксидантных ферментов (SOD1, GPX4, GPX6 и GSR). Относительный уровень транскриптов изучаемых генов исследовали с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) после обратной транскрипции. Тотальную РНК из ткани коры выделяли при помощи набора Aurum Total RNA fatty and fibrous tissue kit (BioRad). Количество и чистоту выделенной РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer (Implen). Тотальную РНК (0,5 мкг) подвергали обратной транскрипции в кДНК, в объеме смеси 25 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием реагентов фирмы Евrogen (Россия), в соответствии с инструкцией производителя при 40°C в течение 40 минут, после чего инактивировали при 92°C в течение 10 минут. Дизайн прямых и обратных праймеров для проведения ПЦР-РВ проводили в программе Primer3 с последующей проверкой в IDT. Праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия), их последовательность приведена в таблице 2. В качестве гена домашнего хозяйства использовали ген HPRT1.

ПЦР-РВ была проведена на амплификаторе CFX-96 фирмы Bio-Rad. Расчет относительной экспрессии проводили, оценивая величины C_t (Threshold cycle), получаемые в ходе проведения ПЦР-РВ. Далее сравнивали уровни экспрессии исследуемых генов в опытных и контрольных образцах с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [20]. Статистическую обработку результатов исследования показателей неврологического статуса, веса тела и биохимических показателей проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Проверку на нормальность распределения данных проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. При условии нормальности рас-

пределения исходных данных для оценки межгрупповых различий использовали t-критерий Стьюдента, если гипотеза нормальности не выполнялась, использовали критерий Манна-Уитни. Для проверки гипотезы об однородности сравниваемых совокупностей данных использовали критерий Фишера. Для решения проблемы множественных сравнений использовали поправку Холма-Бонферони. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показатель выживаемости крыс, которым вводили винкамин на фоне иммунизации, составил 100%, а среди животных, которым не вводили ноотропный препарат в модели ЭАЭ, – 87% (26 крыс). Далее у 18 выживших животных в модели ЭАЭ регистрировали показатели неврологического статуса и вес тела в течение последующих 30 дней; у 8 животных спустя 14 суток после начала иммунизации изучали биохимические и молекулярные показатели.

При оценке неврологического статуса у животных второй группы (модель ЭАЭ) установлено снижение времени удержания на проволочном экране (тест на мышечную силу) на 71% ($p < 0,05$), на деревянном стержне (тест на равновесие) – на 76% ($p < 0,05$), а также на веревке (тест на цепкость-тягу) – на 82% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 1). При введении винкамина в модели ЭАЭ также установлено менее значительное снижение времени выполнения данных тестов животными относительно контрольной группы: время удержания на проволочном экране было ниже на 48% ($p < 0,05$), в тесте на равновесие результат по времени был ниже на 37% ($p < 0,05$), а в тесте на цепкость-тягу – на 39% ($p < 0,05$) (рис. 1).

Снижение веса тела после иммунизации наблюдали как у животных в модели ЭАЭ, так и на фоне введения винкамина и моделирования экспериментального аллергического энцефаломиелита (рис. 2). У животных обеих групп

Таблица 2

Table 2

Последовательности праймеров

Primer sequences

Ген Gene	Прямой праймер Direct Primer	Обратный праймер Reverse Primer	t° плав-ления (°C) Melting point (°C)
SOD1	Gcg-gat-gaa-gag-agg-cat-gtt	Acg-gcc-aat-gat-gga-atg-ct	60
GPX4	Tga-gcc-gct-tat-tga-agc-ca	Cac-acg-caa-ccc-ctg-tac-tt	60
GPX6	Acg-tac-cct-gaa-ctg-aac-aca	Ccg-ttc-aca-tcc-ccc-ttc-tc	60
GSR	Gcc-ttc-acc-ccg-atg-tat-ca	Gcc-aac-cac-ctt-ctc-ctc-ttt	60
HPRT1	Tcc-tcc-tca-gac-cgc-ttt-tc	Atc-act-aat-cac-gac-gct-ggg	60

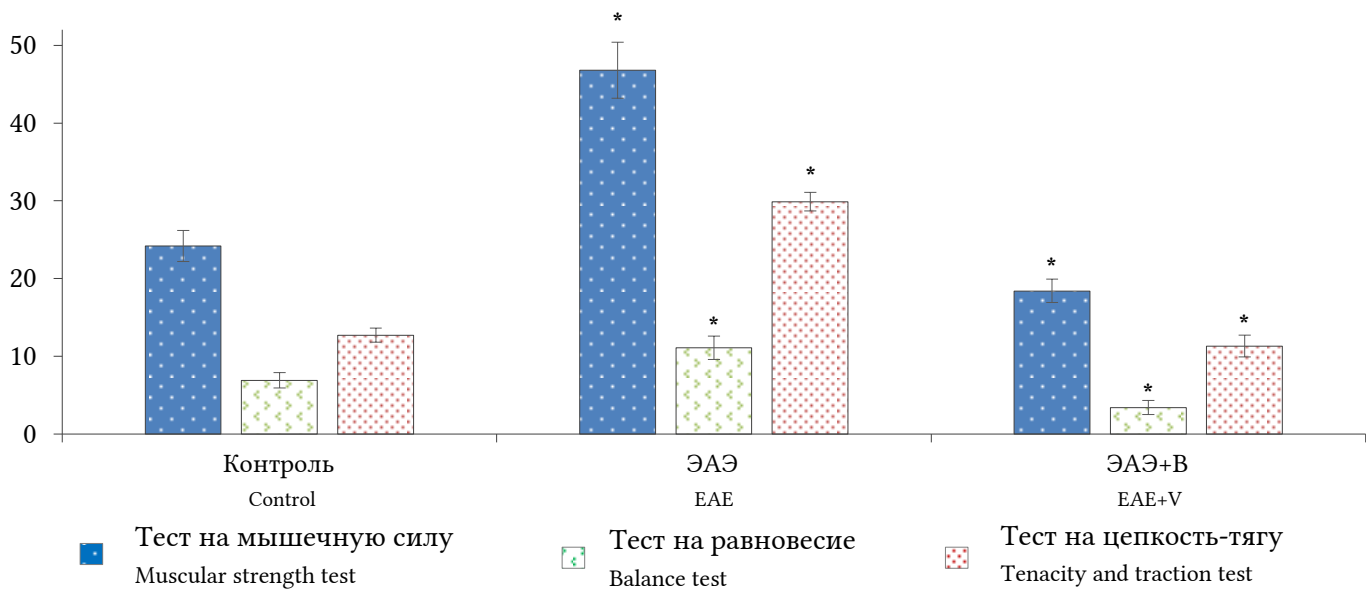


Рис. 1. Время (сек.) выполнения тестов на определение неврологического статуса у крыс контрольной группы в модели рассеянного склероза и при введении винкамина на фоне иммунизации.

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля (при $p < 0,05$).

Fig.1. Time spent during the neurological status determination test among the control group rats within the model of multiple sclerosis and with the introduction of vincamine against the background of immunization.

Note: * – the values differ significantly from the control point (at $p < 0.05$).

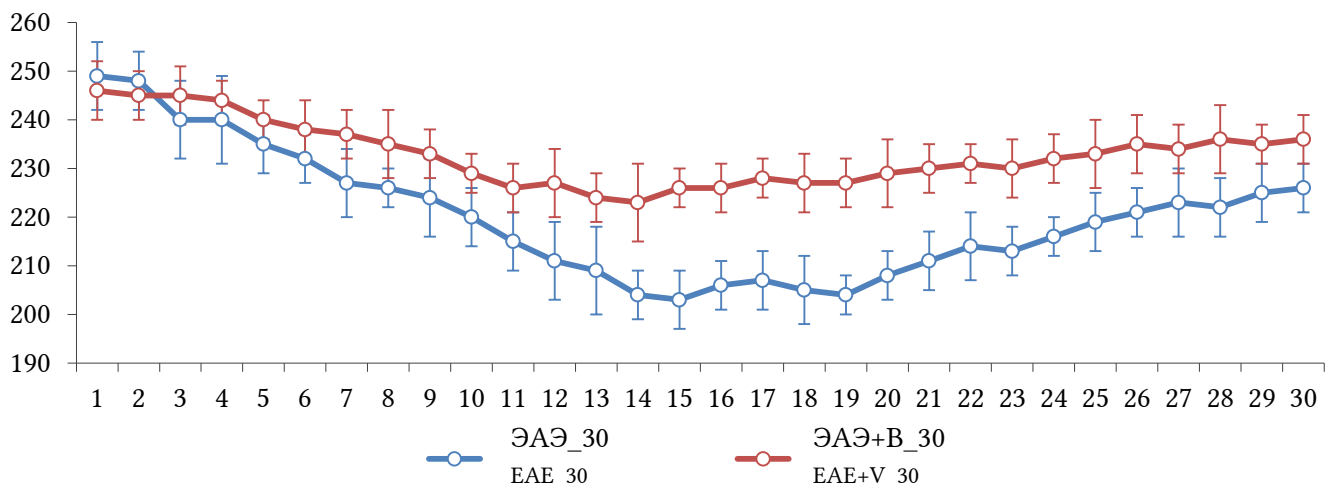


Рис. 2. Изменение веса тела (г) в динамике у иммунизированных крыс на протяжении 30 дней.

Fig. 2. Changes in body weight (in grams) of the immunized rats over the span of 30 days.

статистически значимое снижение веса тела отмечали на 7-9-й день после иммунизации. Однако у крыс, которым от начала первого моделирования ЭАЭ вводили в течение 10 суток винкамин, дальнейшего изменения веса тела не происходило вплоть до окончания эксперимента. У животных, не получавших ноотропный препарат, выявлено дальнейшее снижение веса тела с минимальным значением данного показателя на 15-19 день после иммунизации, однако на данном временном отрезке не отмечено проявление неврологических симптомов. Указанное наблюдение коррелирует с данными литературы, в соответствии с которыми иммунопатологический процесс на данной стадии

заболевания сопровождается активацией фагоцитоза [14] и инициацией окислительного стресса [3]. При изучении состояния антиоксидантной системы защиты наиболее выраженное снижение активности антиоксидантных ферментов установлено на 14-й день эксперимента в соматосенсорной коре у иммунизированных животных.

В группе ЭАЭ_14 наблюдали снижение активности СОД, ГПО и ГР в среднем на 60% ($p < 0,05$) относительно контроля. При введении винкамина в группе ЭАЭ+В_14 эти изменения были менее выраженными: снижение активности СОД, ГПО и ГР составило, соответственно, 27% ($p < 0,05$), 20% ($p < 0,05$) и 31% ($p < 0,05$).

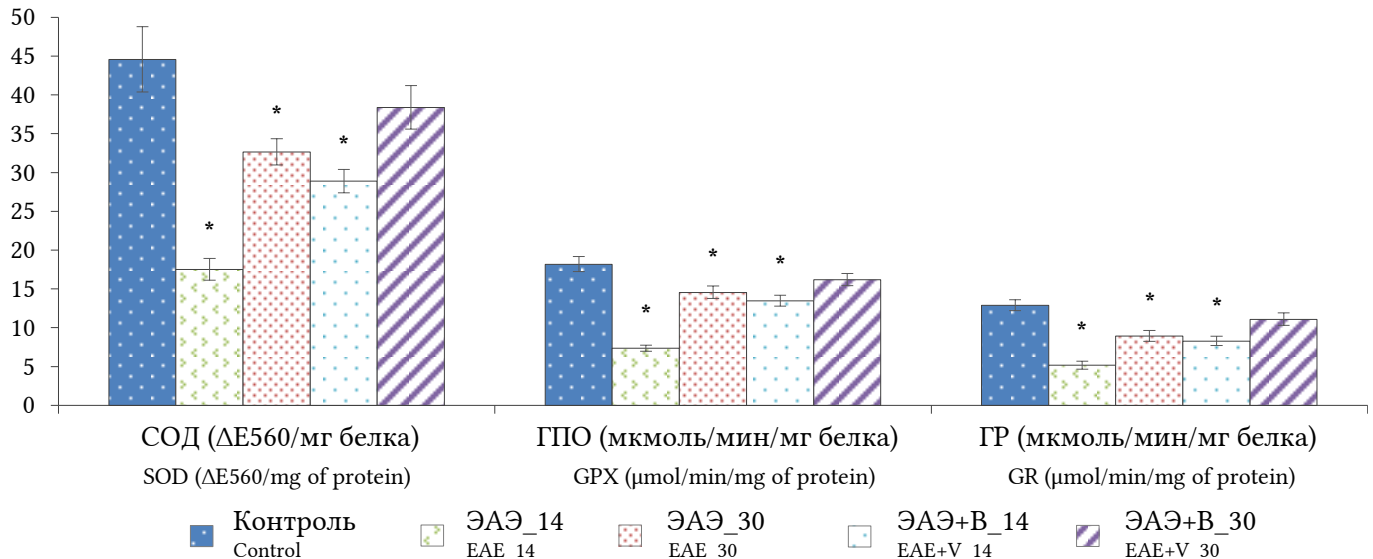


Рис. 3. Активность антиоксидантных ферментов в коре больших полушарий в экспериментальных группах.

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля (при $p < 0,05$).

Fig. 3. Activity of antioxidant enzymes in the cerebral cortex within experimental groups.

Note: * – the values differ significantly from the control point (at $p < 0.05$).

На 30-е сутки после начала иммунизации в группе ЭАЭ_30 также имело место уменьшение активности изучаемых антиоксидантных ферментов, но уровень их активности не отличался от показателей в группе ЭАЭ+В_14. У крыс, которым вводили винкамин на фоне иммунизации, показатели активности антиоксидантных ферментов соответствовали контролю (рис. 3).

Характер и направленность перестройки уровня экспрессии генов исследованных антиоксидантных ферментов были сходными с изменением их активности в соматосенсорной коре. Наиболее выраженное снижение уровня экспрессии генов SOD1 ($p < 0,05$), GPR4 ($p < 0,05$), GPR6 ($p < 0,05$) и GSR ($p < 0,05$) наблюдали у животных в модели ЭАЭ на 14-й день иммунизации.

К 30 суткам после иммунизации установлено снижение уровня экспрессии только двух генов – SOD1 ($p < 0,05$) и GPX6 ($p < 0,05$) относительно контроля, при этом установлено одновременное снижение активности глутатионредуктазы (рис. 4). При введении винкамина на 14-й день после иммунизации отмечали снижение значений уровня экспрессии генов GPR4 ($p < 0,05$), GPR6 ($p < 0,05$) и GSR ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, в то время как на 30-й день не установлено различий экспрессии данных генов между экспериментальной группой ЭАЭ+В_30 и контролем.

Следовательно, изменения активности антиоксидантных ферментов и уровня экспрессии их генов имеют однонаправленный характер, однако на фоне снижения активности ГПО и ГР в модели ЭАЭ_30 и СОД в модели ЭАЭ+В_14

уровень экспрессии их генов не отличался от контроля. Различия величины и направленности изменений активности антиоксидантных ферментов и уровня экспрессии их генов могут быть результатом избыточной продукции активных форм кислорода, что, в свою очередь, является следствием недостаточности регуляторных механизмов, направленных на повышение экспрессии генов соответствующих ферментов, а также их активаторов и (или) ингибиторов.

Полученные результаты позволяют проанализировать этиологические характеристики и выявить возможности нивелирования процесса демиелинизации при рассеянном склерозе в условиях модельного эксперимента.

Известно, что процесс разрушения миелина связан с развитием воспаления и аутоиммунными реакциями. В результате локального аутоиммунного ответа и сосудисто-воспалительного процесса наступает очаговая деструкция белков миелина, повреждение олигодендроцитов, что обуславливает демиелинизацию и аксональную дегенерацию с последующим формированием склеротических бляшек. При этом важно установить предикторы и диагностические критерии начальных стадий заболевания, осуществить поиск ранних маркеров РС, поскольку его верификацию в настоящее время осуществляют уже в период клинической манифестации [23, 33]. Показано формирование внутри- и/или внеозговых бляшек на ранних стадиях заболевания, сопровождающееся снижением регенеративного потенциала мозга

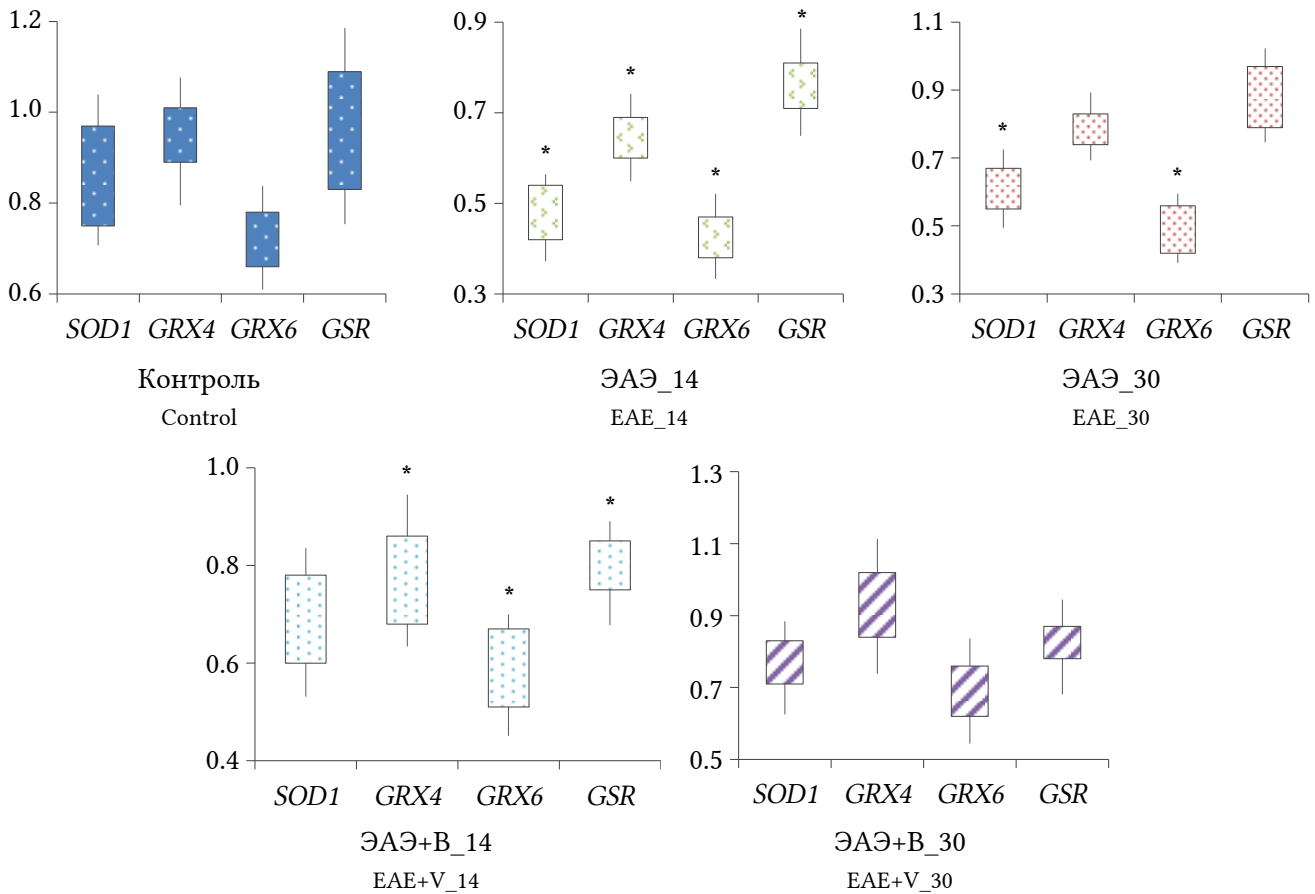


Рис. 4. Уровень экспрессии генов ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) антиоксидантных ферментов в соматосенсорной коре животных экспериментальных групп.

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля (при $p < 0,05$).

Fig. 4. The level of antioxidant enzyme genes' expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) in the somatosensory cortex of experimental groups.
Note: * – the values differ significantly from the control point (at $p < 0.05$).

по мере его прогрессирования [19, 26, 32]. Исследования, связанные со стимуляцией регенерации мозговой ткани при РС, не принесли ощутимых результатов [21].

Раннее начало терапии является абсолютным критерием улучшения качества жизни и увеличения ее продолжительности у больных РС, а также увеличения временного лага наступления когнитивных нарушений [22, 35]. В этой связи исследование действия препаратов, эффективно снижающих или предотвращающих на ранних этапах развития РС аутоиммунный процесс в мозге в модельных экспериментах, остается актуальной проблемой [10]. Благодаря прогрессу в понимании механизмов РС продолжается разработка фармакологических препаратов, большинство из которых по-прежнему имеет целый ряд побочных действий и неэффективно на поздних стадиях заболевания. Применение ноотропных препаратов на доклинической стадии, ранних этапах развития РС не является широко распространенным и в достаточной степени апробированным; лишь единичные источники литературы указывают на их эффективность. Воздействие препаратов

данной группы, вероятно, опосредуется через нейроваскулярное звено, включающее микрососуды, нейроны и клетки глии, функционирующие с использованием биохимических сигналов, недостаточность которого подтверждена при РС. В частности, влияние пирацетама связано с усилением синаптической передачи в лучевом слое области гиппокампа CA1, а также его способностью стимулировать антидепрессивное действие однократной дозы кетамина в случаях поведенческой депрессии [8, 31].

Результаты, полученные в данном исследовании, демонстрируют, что винкамин в модели рассеянного склероза способен оказывать протективное действие, в том числе на ранних стадиях его формирования. Развивающийся окислительный стресс в соматосенсорной коре на этапе клинической стадии ЭАЭ может быть снижен за счет введения данного ноотропа с момента иммунизации животных. Предположительным механизмом ограничения интенсификации свободнорадикальных процессов при введении винкамина является стимуляция экспрессии генов антиоксидантной защиты, что в результате минимизирует эксайтотоксичность

и воспалительный процесс в мозге уже на клинической стадии заболевания. В результате у животных, которым вводили винкамин в модели ЭАЭ, наблюдали снижение неврологического дефицита. Правомерность этого подтверждается исследованиями экспрессии генов антиоксидантных ферментов, анализом неврологического статуса на разных этапах развития модели рассеянного склероза, а также данными, согласно которым низкие дозы ноотропов способны оказывать нейропротекторное и антиоксидантное действие [5, 7]. Дальнейшее исследование механизмов действия ноотропных препаратов в модели рассеянного склероза может определить возможность расширения показаний к применению их в неврологической практике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование выполнено с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Исследование одобрено Этическим комитетом Ростовского государственного медицинского университета (Протокол № 8/21 от «22» апреля 2021 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Автор заявляет об отсутствии финансирования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. Методические рекомендации. Санкт-Петербург, 2008. 104 с. [Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. *Methods for assessing free radical oxidation and the antioxidant system of the body. Guidelines*. St-Petersburg, 2005. 208 p. (in Russ.)]
2. Карантыш Г.В., Гафиятуллина Г.Ш., Менджерицкий А.М., Прокофьев В.Н., Жукова М.В., Макаров В.А. Влияние виндебурнола на неврологический статус и морфологические изменения в головном мозге крыс в модели экспериментального аллергического энцефаломиелимита. *Современные проблемы науки и образования*. 2018;(1):84 [Karantysh G.V., Gafiyatullina G.Sh., Mendzheritskii A.M., Prokofev V.N., Zhukova M.V., Makarov V.A. The effect of vindeburnol on neurological status and morphological changes in the rat brain in a model of experimental allergic encephalomyelitis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2018;(1):84 (in Russ.)]
3. Луцкий М.А., Земсков А.М., Разинкин К.А. Биохимические маркеры окислительного стресса при различных клинических формах и стадиях течения рассеянного склероза. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2014;114(11):74–77 [Lutskiy M.A., Zemskov A.M., Razinkin K.A. Biochemical markers of oxidative stress in various clinical forms and stages of multiple sclerosis. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2014;114(11):74–77 (in Russ.)]
4. Пажигова З.Б., Карпов С.М., Шевченко П.П., Бурнус Н.И. Распространенность рассеянного склероза в мире (обзорная статья). *Международный журнал экспериментального образования*. 2014;1(2):78–82 [Pazhigova Z.B., Karpov S.M., Shevchenko P.P., Burnus N.I. Prevalence of multiple sclerosis in the world (review). *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya*. 2014;1(2):78–82 (in Russ.)]
5. Саркисян О.Г. Новые возможности прогнозирования атрофических изменений во влагалищной ткани у женщин в пострепродуктивном периоде. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2016;6(161):118–122 [Sarkisyan O.G. New possibilities of atrophic changes predicting in vaginal tissue at women in post reproductive period. *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2016;6(161):118–122 (in Russ.)]
6. Стратегия развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года, 2012 [Strategy for the development of medical science in the Russian Federation within the period up to 2025, 2012 (in Russ.)]
7. Abdel-Salam O.M.E., Hamdy S.M., Seadawy S.A.M. et al. Effect of piracetam, vincamine, vinpocetine, and donepezil on oxidative stress and neurodegeneration induced by aluminum chloride in rats. *Comp Clin Path.* 2016;(25):305–318. DOI: 10.1007/s00580-015-2182-0
8. Abramets I.I., Kuznetsov Y.V., Evdokimov D.V., Zai-ka T.O. Piracetam potentiates neuronal and behavioral effects of ketamine. *Research Results in Pharmacology*. 2019;5(2):49–55. DOI: 10.3897/rrpharmacology.5.35530
9. Adamczyk B., Adamczyk-Sowa M. New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;(2016):1973834. DOI: 10.1155/2016/1973834
10. Aharoni R., Schottlender N., Bar-Lev D.D., Eilam R., Sela M., Tsoory M., Arnon R. Cognitive impairment in an animal model of multiple sclerosis and its amelioration by glatiramer acetate. *Sci Rep*. 2019;9(1):4140. DOI: 10.1038/s41598-019-40713-4
11. Beutler E. Red cell metabolism: A Manual of Biochemical Methods. Grune and Stratton, 1975. 160 p.
12. Cerqueira J.J., Compston D.A.S., Gerales R., Rosa M.M., Schmierer K., Thompson A., Tinelli M., Palace J. Time matters in multiple sclerosis: can early treatment and long-term follow-up ensure everyone benefits from the latest advances in multiple sclerosis?

- sis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(8):844–850. DOI: 10.1136/jnnp-2017-317509
13. Combs D.J., D'Alecy L.G. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol. *Stroke*. 1987;18(2):503–511. DOI: 10.1161/01.str.18.2.503
14. Degano A.L., Roth G.A. Passive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats: dissociation of clinical symptoms and biochemical alterations. *J Neurosci Res*. 2000;59(2):283–290. DOI: 10.1002/(sici)1097-4547(20000115)59:2<283::aid-jnr15>3.0.co;2-s
15. Fetisova E., Chernyak B., Korshunova G., Muntyan M., Skulachev V. Mitochondria-targeted Antioxidants as a Prospective Therapeutic Strategy for Multiple Sclerosis. *Curr Med Chem*. 2017;24(19):2086–2114. DOI: 10.2174/0929867324666170316114452
16. Forslin M., Fink K., Hammar U., von Koch L., Johansson S. Predictors for Employment Status in People with Multiple Sclerosis: A 10-Year Longitudinal Observational Study. *Arch Phys Med Rehabil*. 2018;99(8):1483–1490. DOI: 10.1016/j.apmr.2017.12.028
17. Fisniku L.K., Chard D.T., Jackson J.S., Anderson V.M., Altmann D.R., Miszkil K.A., Thompson A.J., Miller D.H. Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2008;64(3):247–254. DOI: 10.1002/ana.21423
18. Günzler W.A., Flohé L. *Glutathione peroxidase*. In: Greenwald R.A., editor. *Handbook of methods for oxygen research*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985. 285–290
19. Kuhlmann T., Ludwin S., Prat A., Antel J., Brück W., Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 2017;133(1):13–24. DOI: 10.1007/s00401-016-1653-y
20. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
21. Lubetzki C., Zalc B., Williams A., Stadelmann C., Stankoff B. Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *Lancet Neurol*. 2020;19(8):678–688. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30140-X
22. Lunde H.M.B., Assmus J., Myhr K.M., Bø L., Grytten N. Survival and cause of death in multiple sclerosis: a 60-year longitudinal population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(8):621–625. DOI: 10.1136/jnnp-2016-315238
23. Malpas C.B., Manouchehrinia A., Sharmin S., Roos I., Horakova D., Havrdova E.K., Trojano M., Izquierdo G. et al. Early clinical markers of aggressive multiple sclerosis. *Brain*. 2020;143(5):1400–1413. DOI: 10.1093/brain/awaa081
24. Mannie M., Swanborg R.H., Stepaniak J.A. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Curr Protoc Immunol*. 2009;Chapter 15:Unit 15.2. DOI: 10.1002/0471142735.im1502s85
25. Micháličková D., Hrnčíř T., Canová N.K., Slanař O. Targeting Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in multiple sclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2020;(873):172973. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.172973
26. Miller E.D., Dziedzic A., Saluk-Bijak J., Bijak M. A Review of Various Antioxidant Compounds and their Potential Utility as Complementary Therapy in Multiple Sclerosis. *Nutrients*. 2019;11(7):1528. DOI: 10.3390/nu11071528
27. Okuda D.T., Mowry E.M., Beheshtian A., Waubant E., Baranzini S.E., Goodin D.S., Hauser S.L., Pelletier D. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009;72(9):800–805. DOI: 10.1212/01.wnl.0000335764.14513.1a
28. Paxinos G.T., Watson Ch. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Fourth Edition). Academic Press. San Diego, California, USA: Academic Press. 1998. 256p.
29. Pegoretti V., Swanson K.A., Bethea J.R., Probert L., Eisel U.L.M., Fischer R. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;(2020):7191080. DOI: 10.1155/2020/7191080
30. Polak P.E., Kalinin S., Braun D., Sharp A., Lin S.X., Feinstein D.L. The vincamine derivative vindeburnol provides benefit in a mouse model of multiple sclerosis: effects on the Locus coeruleus. *J Neurochem*. 2012;121(2):206–216. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07673.x
31. Popova N.F., Kamchatnov P.R., Riabukhina O.V. Omapron in the complex treatment of patients with multiple sclerosis. *S.S. Korsakov J of Neurology and Psychiatry*. 2010;110(11):17–20.
32. Raine C.S. Multiple sclerosis: The resolving lesion revealed. *J Neuroimmunol*. 2017;(304):2–6. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.05.021
33. Ruano L., Portaccio E., Goretti B., Niccolai C., Severo M., Patti F., Cilia S., Gallo P. et al. Age and disability drive cognitive impairment in multiple sclerosis across disease subtypes. *Mult Scler*. 2017;23(9):1258–1267. DOI: 10.1177/1352458516674367
34. Sivalingam K., Samikkannu T. Neuroprotective Effect of Piracetam against Cocaine-Induced Neuro Epigenetic Modification of DNA Methylation in Astrocytes. *Brain Sci*. 2020;10(9):611. DOI: 10.3390/brainsci10090611
35. Solaro C., Ponzio M., Moran E., Tanganelli P., Pizio R., Ribizzi G., Venturi S., Mancardi G.L. et al. The changing face of multiple sclerosis: Prevalence and incidence in an aging population. *Mult Scler*. 2015;21(10):1244–1250. DOI: 10.1177/1352458514561904
36. Tárnok K., Kiss E., Luiten P.G., Nyakas C., Tihanyi K., Schlett K., Eisel U.L. Effects of Vinpocetine on mitochondrial function and neuroprotection in primary cortical neurons. *Neurochem Int*. 2008;53(6-8):289–295. DOI: 10.1016/j.neuint.2008.08.003
37. Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W.M., Coetzee T., Comi G., Correale J., Fazekas F. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162–173. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2

Поступила в редакцию 17.03.2021

Подписана в печать 23.10.2021

Для цитирования: Карантыш Г.В., Гафиятуллина Г.Ш., Мендзеритский А.М. Фармакологическая коррекция винкамином системы антиоксидантной защиты в мозге в модели рассеянного склероза. *Человек и его здоровье*. 2021;24(2):27–36. DOI: 10.21626/vestnik/2021-2/04

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF ANTIOXIDANT PROTECTION SYSTEM IN THE BRAIN WITH VINCAMINE WITHIN THE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

© Karantysh G.V.¹, Gafiyatullina G.Sh.², Mendzheritskii A.M.³

¹ Southern Federal University (SFU)

105/42, Bolshaya Sadovaya st., Rostov-on-Don, Rostov region, 344006, Russian Federation

² Rostov State Medical University (RostSMU)

29, Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, Rostov region, 344022, Russian Federation

³ Don State Technical University (DonSTU)

1, Gagarin Square, Rostov-on-Don, Rostov region, 344000, Russian Federation

Objective. In the course of the research, the effect of vincamine (nootropic drug) on neurological status, as well as the activity of antioxidant enzymes and the level of their coding genes' expression in the somatosensory cortex of rats within the model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) were being studied. Relevance: the topicality of studying the mechanisms of multiple sclerosis in the early stages of its development is dictated by the need to search for markers of the disease and its therapy before the onset of its clinical manifestation.

Materials and methods. The animals' neurological status was studied using muscular strength, balance, tenacity and traction tests. Rates of survival and the rats' body weight were also being evaluated. The study of activity antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPO), and glutathione reductase (GR), as well as the expression of *SOD1*, *GPX4*, *GPX6*, and *GSR* genes was conducted on the 14th and 30th day of immunization.

Results. The percentage of vincamine-injected animals' survival was 100% versus 87% among rats that were not injected with the nootropic drug during immunization ($p < 0,05$). Besides, after the injection of vincamine, a less significant decrease in body weight ($p < 0,01$) and a less pronounced neurological deficit ($p < 0,05$) in comparison with immunized non-injected animals were reported. The vincamine injection contributed to an increase in all studied antioxidant enzymes' activity and the level of their genes' expression in the somatosensory cortex.

Conclusion. Against the background of vincamine injection, a minimization of neurological deficit is being observed, probably due to a decrease in oxidative stress in the rat brain during the clinical stage of experimental allergic encephalomyelitis.

Keywords: multiple sclerosis; vincamine; pro- and antioxidant status; expression of *SOD1*, *GPX4*, *GPX6*, and *GSR* genes in the brain.

Karantysh Galina V. – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Professor of the Department of Correctional Pedagogy, SFU, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9130-6491. E-mail: karantysjgv@mail.ru

Gafiyatullina Guzel Sh. – Dr. Sci. (Med.), Professor, Vice-Chancellor on Training Foreign Citizens and International Cooperation, Professor of the Physiology Department, RostSMU, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-7656-2101. E-mail: ggsh@aanet.ru (correspondence author)

Mendzheritskii Aleksandr M. – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Professor of the Department of Biology and General Pathology, DonSTU, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-5584-9763. E-mail: amendzheritskiy@mail.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The research was approved by the Regional Ethics Committee of Kursk state medical university (Protocol No 9 of 14.11.2016). Informed consent was obtained from all the patients to participate in the study.

Received 17.03.2021

Accepted 23.10.2021

For citation: Karantysh G.V., Gafiyatullina G.Sh., Mendzheritskii A.M. Pharmacological correction of antioxidant protection system in the brain with Vincamine within the model of multiple sclerosis. *Humans and their health*. 2021;24(2):27–36. DOI: 10.21626/vestnik/2021-2/04