

**БОЧАРОВ
ЕВГЕНИЙ ВАЛЕРИЯНОВИЧ**

**КОРРЕКЦИЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ФИТОАДАПТОГЕНА
(КЛИНИКО - ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.00.16 - Патологическая физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва - 2006

Работа выполнена в лаборатории общей патофизиологии нервной системы
Государственного учреждения Научно-исследовательского института общей
патологии и патофизиологии Российской АМН

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН
доктор медицинских наук, профессор

Г.Н. Крыжановский
И.А. Иванова-Смоленская

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор
Доктор медицинских наук, профессор

В.А. Евсеев
А.С. Кадыков

Ведущее учреждение:

Российский Государственный Медицинский Университет

Защита состоится «_____» _____ 2006 г. в _____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 001.003.01 при Научно-исследовательском институте
общей патологии и патофизиологии РАМН по адресу: 125315, Москва, Балтийская
ул., дом 8.

Автореферат разослан «_____» _____ 2006 г.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научно-исследовательского
института общей патологии и патофизиологии РАМН.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Л.Н. Скуратовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Болезнь Паркинсона (БП) является одной из часто встречающихся форм среди нейропатологических заболеваний у людей пожилого возраста. Распространенность БП в общей популяции населения составляет 0,15 - 0,18 % и достигает 7 % среди лиц старше 60 лет. [Яхно Н.Н., 1995; Hauser R.A., Zesiewicz T.A., 1997; de Lau L.M., Breteler M.M., 2006]. Однако первоначальные симптомы могут появиться в возрасте 21-40 лет, а при ювенильной форме заболевания – до 20 лет. Раннее возникновение БП отмечается у 5-10% больных [Schrag A., Schott J.M., 2006].

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой хроническое, неуклонно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, приводящее к тяжелой инвалидности. Ключевым звеном патогенеза БП является селективное повреждение и гибель большей части пула дофаминергических нигростриатных нейронов, что приводит к снижению уровня дофамина (ДА) в стриатуме [Jellinger K.A., 1994; Leng A., 2004; Carvey P.M. et al., 2006]. Дефицит тормозного нейротрансмиттера ДА индуцирует гиперактивацию стриатных холинергических нейронов и, как следствие этого, образование генератора патологически усиленного возбуждения, который формирует патологическую детерминанту и патологическую систему паркинсонического синдрома [Крыжановский Г.Н., 1980; 1997].

Среди причин, приводящих к смерти нигральных дофаминергических нейронов, важную роль отводят образованию свободных радикалов и оксидативному стрессу, нарушению дыхательной функции митохондрий и энергетическому дефициту, активации НМДА-глутаматных рецепторов и др. [Cadet J.L., Brannock C., 1998; Schapira A.H. et al, 1998; Schapira A.H., 2006; Keeney P.M. et al., 2006].

Вместе с тем следует учесть, что нарушение взаиморегуляции нервной, эндокринной и иммунной систем создает риск и обеспечивает развитие заболевания [Евсеев В.А. и др., 2002; Евсеев В.А., 2006]. Действительно, у пациентов с БП выявлены более глубокие в сравнении соответствующим возрастным контролем нарушения иммунной и эндокринной систем: уровень плазменного кортизола завышен в большей степени, чем у здоровых людей соответствующей возрастной категории, что обуславливает более выраженное отрицательное влияние глюкокортикоидов на организм, в частности на иммунную систему. При БП выявлено подавление Т- и В- клеточного звена иммунитета, а также повышение уровня медиаторов воспаления на фоне снижения продукции интерферонов, что связывают с воспалительными процессами в микроглии

головного мозга [Blazejova K. S. et al., 2000; Lloberas J., Celada A., 2002; Hakansson A. et al., 2005].

В соответствии с современной концепцией патогенеза БП разработаны стратегия и основные принципы терапии этого заболевания [Яхно Н.Н. и др., 1995; Шток В.Н., Федорова Н.В., 1997; Маньковский Н.Б., Карабань И.Н., 1998; Крыжановский Г.Н. и др., 2002; Иванова-Смоленская И.А., 2006; Stern M.V., 1997; Olanov C.W., et al., 1998; Soderstrom K. et al., 2006].

В клинике основным методом лечения болезни Паркинсона остается заместительная терапия в виде предшественника дофамина - L-3,4-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА). Однако данная терапия является симптоматической и не направлена на устранение главной причины заболевания - дегенерации нигральных дофаминергических нейронов. Более того, длительное применение леводопа-содержащих препаратов приводит к развитию моторных флюктуаций и тяжелых побочных эффектов (дискинезий, деменций, галлюцинаций и др.) [Ogawa N. et al., 2005; Kulkantrakorn K. et al., 2006].

Многофакторный характер патогенеза БП обуславливает необходимость комплексной патогенетической терапии (КПТ) этого заболевания [Крыжановский Г.Н. и др., 2002]. Принцип КПТ, определенный Г.Н. Крыжановским (1986, 1997), заключается в сочетанном воздействии лечебными средствами на различные звенья патологической системы, лежащей в основе нейропатологического синдрома, и на разные патогенетические механизмы патологического процесса. Поскольку патогенетические механизмы патологического процесса и звенья патологической системы взаимосвязаны, сочетанное воздействие на них дает потенцированный лечебный эффект и позволяет снизить или избежать побочные эффекты, которые возникают при монотерапии большими дозами лекарственных препаратов.

Несмотря на достижения в разработке терапии болезни Паркинсона, ее успехи лимитируются отсутствием достаточно эффективных средств, обладающих нейропротекторными и нейротрофическими свойствами [Roewe W., 2006]. Для повышения эффективности КПТ очевидна необходимость поиска новых нейропротекторов и нейротрофогенов. Поэтому повышение эффективности комплексной патогенетической терапии БП является актуальной проблемой медицины.

В связи с вышеизложенным наше внимание привлекли фитоадаптогены (женьшень, элеутерококк и др.), обладающие нейропротекторными, нейротрофическими и антиоксидантными свойствами. Показано, что сапонины и гинзенозиды Rb1 и Rg1, являющиеся биологически активными компонентами

женьшеня, блокируют NMDA-рецепторы, снижают активность апоптотического фермента каспазы-3, содержание внутриклеточного Ca^{2+} и нейротоксичность глутамата, ингибируют чрезмерное образование свободных радикалов и NO, защищают дофаминергические нейроны от повреждения [Kim Y.C, 1999; Rudakewich M., et al., 2001; Kim S. et al., 2002; Chen X.C. et al., 2003; Lee J.Y., et al., 2004]. Действительно, распространенность БП в Китае в 5 раз ниже по сравнению с США, что связывают с повышенным потреблением женьшеня и других адаптогенов китайским населением [Tanner C.M., Ben Shlomo Y., 1999].

Фитомикс-40 (ФМ-40) - комплексный растительный препарат, содержащий фитоадаптогены (женьшень, элеутерококк, родиолу розовую и др.). Состав ФМ-40 защищен патентом РФ № 2099410. Препарат сертифицирован в качестве парафармацевтика. В клинических исследованиях у пациентов пожилого возраста показано, что он проявляет выраженные антиоксидантные, антимуtagenные, иммуно-, и гормонотомулирующие свойства [Бочарова О.А., Барышников А.Ю., 2004].

Целью исследования явилось изучение влияния комплексного фитоадаптогена на патогенетические механизмы паркинсонизма и определение его возможностей повышения эффективности комплексной патогенетической терапии болезни Паркинсона.

Задачи исследования

1. Изучение влияния фитоадаптогена ФМ-40 на развитие МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей.
2. Исследование воздействия фитоадаптогена ФМ-40 на содержание малонового диальдегида, уровень дофамина, его метаболитов (ДОФУК, ГВК) и серотонина в стриатуме мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом.
3. Проведение клинического обследования пациентов с БП.
4. Определение показателей иммунного, антиоксидантного статусов, уровня гормона кортизола, а также содержания цитокинов ИЛ-6, ФНО- α , ИФН- γ у пациентов с БП.
5. Сравнительная оценка клинических и иммунобиологических показателей в динамике стандартной антипаркинсонической терапии БП без использования ФМ-40, а также на фоне приема препарата.
6. Оценка перспективности использования ФМ-40 в комплексной патогенетической терапии БП.

Научная новизна исследования

Впервые выявлен антипаркинсонический эффект фитоадаптогена ФМ-40 и определена его взаимосвязь с терапевтическим воздействием на ключевые нейрохимические механизмы патогенеза БП.

Впервые показана возможность повышения эффективности терапии БП при использовании ФМ-40. Курсовое применение ФМ-40 в комплексной патогенетической терапии БП уменьшает тяжесть паркинсонических симптомов тремора и ригидности, повышая повседневную и двигательную активность пациентов.

Впервые показано, что под влиянием ФМ-40 повышается активность факторов естественной антиоксидантной системы (глутатион, глутатион-S-трансфераза, супероксиддисмутаза, каталаза) и уменьшается содержание токсичного продукта ПОЛ (малонового диальдегида) в крови пациентов с БП.

Впервые выявлено, что ФМ-40 корригирует нарушенные показатели иммунного статуса у пациентов с БП, снижает уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- α , увеличивает содержание ИНФ- γ , а также уменьшает уровень кортизола в крови.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показана и научно обоснована возможность повышения эффективности комплексной патогенетической терапии пациентов с БП при использовании фитоадаптогена ФМ-40. Под влиянием ФМ-40 уменьшается тяжесть паркинсонических симптомов и повышается качество жизни больных.

Определена связь антипаркинсонического эффекта ФМ-40 с терапевтическим воздействием на ключевой нейрохимический механизм патогенеза БП (дефицит ДА в стриатуме), что позволяет определить ФМ-40 как средство патогенетической терапии. Применение ФМ-40 позволяет снизить дозу леводопасодержащих препаратов, оказывающих тяжелый побочный эффект. Установлена возможность коррекции механизмов естественной антиоксидантной защиты и интенсивности ПОЛ, а также иммунного статуса, содержания цитокинов и кортизола у пациентов с БП при использовании ФМ-40.

Обоснована перспективность внедрения ФМ-40 в клинику для повышения эффективности комплексной патогенетической терапии БП.

Основные положения, выносимые на защиту

1. ФМ-40 повышает эффективность комплексной патогенетической терапии БП. Механизм антипаркинсонического эффекта ФМ-40 связан с терапевтическим воздействием на ключевые нейрохимические механизмы БП: препарат уменьшает

дефицит ДА в стриатуме, активирует факторы естественной антиоксидантной защиты (глутатион, глутатион-S-трансферазу, супероксиддисмутазу, каталазу), уменьшает содержание малонового диальдегида (МДА).

2. ФМ-40 оказывает иммуномодулирующее действие, снижает уровень кортизола в крови пациентов с БП.

Апробация работы

Апробация работы состоялась 25 апреля 2006 г. на совместной научной конференции лабораторий общей патофизиологии нервной системы; нейроиммунопатологии; патофизиологии боли, стресса и адаптации; группы по изучению ишемии мозга ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН; отделения нейрогенетики ГУ НИИ неврологии РАМН и лаборатории иммунофармакологии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Основные результаты работы доложены на 5-ом Центральном Европейском симпозиуме по фармацевтической технологии и биотехнологии (Любляна, Словения, 2003 г.); 3-ем Российском конгрессе по патофизиологии с международным участием (Москва, 2004 г.); 8-ом конгрессе Европейской федерации неврологических обществ (Париж, Франция, 2004 г.); 2-ом Украинском симпозиуме по паркинсонизму с международным участием (Киев, Украина, 2004 г.); 8-ой Европейской конференции по нейропсихофармакологии (Москва, 2005 г.); 5-ой Всероссийской научно-практической конференции по биотерапии (Москва, 2006 г.); 4-ой Российской конференции по нейроиммунопатологии (Москва, 2006 г.); 10-ом конгрессе Европейской федерации неврологических обществ (Глазго, Великобритания 2006 г.); 5-ом международном Конгрессе по патофизиологии (Пекин, Китай, 2006);.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, и списка литературы. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 6 рисунками. Библиография включает 316 источника, из которых 82 отечественных и 234 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Экспериментальная часть работы выполнена в лаборатории общей патофизиологии нервной системы ГУ НИИ ОПП РАМН (зав. лаб. - академик РАМН Г.Н. Крыжановский). **Клинические исследования** проведены на базе отделения нейрогенетики ГУ НИИ неврологии РАМН (зав. отделением - проф. И.А. Иванова-Смоленская) совместно с к.м.н. В.В.Полещуком.

Паркинсонический синдром (ПС) моделировали у мышей линии C57BL/6 многократным внутрибрюшинным введением нейротоксина МФТП (20 мг/кг дважды в сутки с интервалом 12 ч в течение 10 сут). О развитии синдрома судили по выраженности олигокинезии и мышечной ригидности. Олигокинезию оценивали по изменению горизонтальной двигательной активности животных. Двигательную активность животных определяли по тесту "открытого поля" в автоматическом режиме с помощью системы Opto-Varimex-3 ("Columbus Instruments", США). Ригидность оценивали по симптому "горбатости" и выражали в баллах. ФМ-40 давали мышам per os в виде 2 и 10 % раствора в течение 7 суток до и 10 суток после начала введения МФТП. Об интенсивности ПОЛ в гомогенатах мозга и стриатуме судили по уровню малонового диальдегида (МДА), который определяли спектрофлуориметрическим методом [Гаврилов В.Б. и др., 1987].

Содержание ДА и его метаболитов - диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК), а также уровень серотонина (5-НТ₂) в стриатуме определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с электрохимическим детектором в модификации (Kontur P., et al., 1984) и выражали в нмоль/мг ткани. Нейрохимические исследования проводили в лаборатории нейрохимии ГУ НИИ фармакологии РАМН (зав. лаб. - член-корр. РАМН К.С. Раевский) с участием в.н.с., к.б.н. В.С. Кудрина.

Для определения антиоксидантной активности препарата ФМ-40 *in vitro* ПОЛ индуцировали с помощью аскорбата ($2 \cdot 10^{-4}$ М) и железа Fe⁺² (10^{-5} М) в гомогенате головного мозга мышей. Концентрация ФМ-40 в пробах составила $3,3 \cdot 10^{-2}$, $3,3 \cdot 10^{-3}$ и $3,3 \cdot 10^{-4}$ г/л.

Характеристика препарата. ФМ-40 представляет собой водно-спиртовой экстракт (30 % этанола) на основе сорока целебных растений, включая женьшень, родиолу розовую, лимонник, элеутерококк колючий, чагу, можжевельник, пижму, зверобой, сосновые и березовые почки, калган, бессмертник, эвкалипт, одуванчик,

душицу, пустырник, валерьяну, ягоды боярышника, шиповника, черники, клюквы, черной смородины и др.

В клиническое исследование включено 32 пациента с верифицированным диагнозом БП в возрасте от 43 до 78 лет (средний возраст $60,8 \pm 2$). Продолжительность БП у пациентов составила в среднем $5,2 \pm 0,7$ лет (минимальная - 1 год, максимальная - 21 год). Дрожательно-ригидная форма заболевания присутствовала у 16 человек, ригидно-дрожательная - у 15; 1 человек был болен акинетико-ригидной формой. Пациенты получали комплексную антипаркинсоническую терапию, которая включала L-ДОФА-содержащие препараты ("Наком", "Синемет CR", "Мадопар"), а также ПК-Мерц, Мирапекс, Проноран, Ременил, Амитриптилин, Феназепам, витамин Е и др. Средняя доза L-ДОФА-содержащих препаратов по группе за период лечения ($5,2 \pm 0,7$ лет) составила $411,5 \pm 134,6$ г/чел (минимальная - 1,0 г/чел, максимальная - 1370 г/чел). За пациентами вели клиническое и лабораторное наблюдение в течение 3 месяцев. Затем было проведено 2 курса лечения с использованием ФМ-40 с 2-х недельным перерывом между ними. Курс приема препарата составлял 1,5 месяца в дозе 45 мл/75 кг веса/сут.: 15 мл препарата + 5 мл воды за 15-20 минут перед едой 3 раза в день. После окончания курсов (через 3 месяца) также было проведено клиническое и лабораторное обследование пациентов. Для объективной оценки степени выраженности неврологических нарушений использовали унифицированную рейтинговую шкалу БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) [Fahn S., Elton R., 1987]. Определяли суммарный балл шкалы по разделу II (нарушения дневной активности) и III (двигательные нарушения пациентов с БП).

Показатели иммунного статуса (содержание лимфоцитов с экспрессией дифференцировочных антигенов CD3, CD4, CD8, CD16, CD20; активационных антигенов CD25, HLA-Dr, CD95; молекул адгезии CD11b, CD18) исследовали, используя иммунофлюоресцентный метод. Относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих исследуемые антигены, определяли на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson США) в гейте лимфоцитов. Цитокины ИЛ-6, ФНО- α и ИФН- γ определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы ООО "Цитокин" (Россия). Гормон кортизол в сыворотке крови пациентов с БП определяли иммуноферментным методом с использованием диагностических наборов фирм "Roche" и "Orion Diagnostics". Содержание малонового диальдегида (МДА) в плазме крови больных БП определяли по образованию окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу малонового диальдегида и

две молекулы тиобарбитуровой кислоты. [Uchiyama M., Mihaara M., 1978]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по восстановлению нитротетразолиевого синего в системе ксантин-ксантиноксидаза [Beauchamp C., Fridovich J., 1971]. Активность каталазы оценивали по скорости утилизации перекиси водорода [Beers R., Sizer J., 1952]. Содержание глутатиона определяли по реакции с 5,5 дитио-бис(2-нитробензойной кислотой) [Tietze F., 1968]. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли по скорости образования конъюгатов восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом. [Habig W., Jakoby W., 1981].

Исследования проведены совместно с лабораторией иммунофармакологии ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (зав. лаб. - д.б.н. О.А. Бочарова).

Для статистической обработки данных использовали дисперсионный анализ ONE-WAY ANOVA, Newman-Keuls тест, а также непараметрический критерий Kruskal-Wallis ANOVA с последующим анализом по тесту Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные исследования

Наиболее выраженное снижение двигательной активности при МФТП-индуцированном ПС отмечено в группах животных 2 и 3 (рис. 1). Длина пробега животных на 5-е сутки введения МФТП составила 15-18% от уровня здоровых мышей группы 1, достигнув снижения до 7-9% к 10-м суткам эксперимента. ФМ-40 в 10% концентрации (5 группа) достоверно препятствовал развитию гипокинезии как на 5-е, так и на 10-е сутки введения МФТП. Длина пробега животных при этом составила 71 и 69% соответственно от уровня показателя мышей группы 1. ФМ-40 в 2% концентрации (4 группа) препятствовал снижению двигательной активности мышей с паркинсоническим синдромом на 5-е сутки. Длина пробега животных при этом составила 53% от уровня нормы. К 10-му дню изменения двигательной активности были незначительными по сравнению с группами 2 и 3 (Рис. 1).

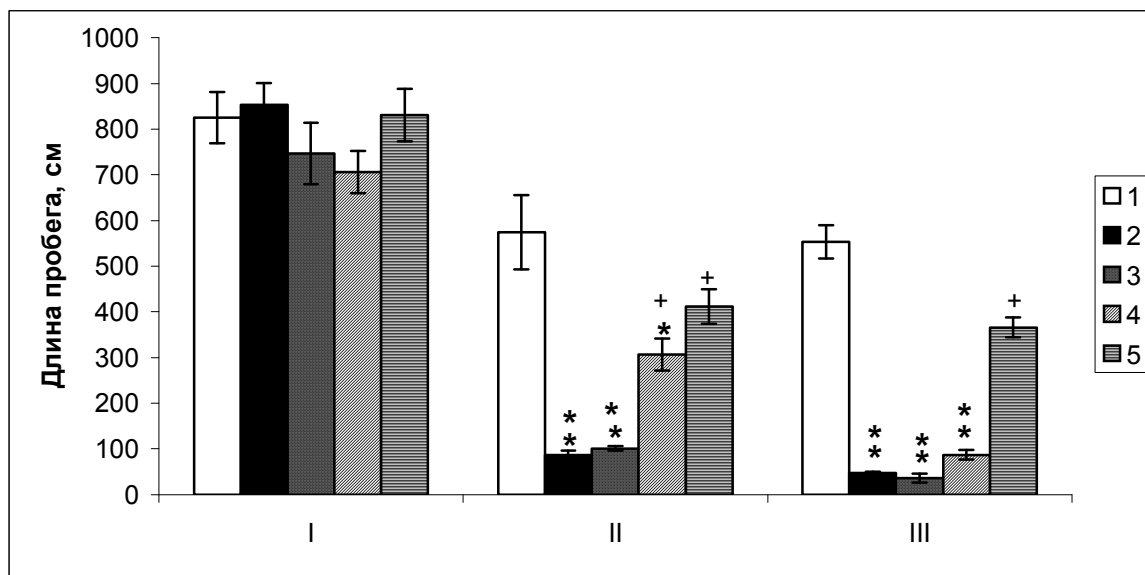


Рис. 1. Влияние Фитомикса-40 на двигательную активность (длина пробега, см) мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом до (I), после 5 (II) и 10 (III) сут от начала инъекции МФТП.

1 – NaCl; 2 – МФТП+NaCl; 3 – МФТП + этанол; 4 – МФТП + 2% ФМ-40; 5 – МФТП + 10% ФМ-40. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$ по сравнению с группой 1; + - $P < 0,05$ в сравнении с группой 3 (МФТП + этанол). Число животных в группах: 8-10.

На 5-й день эксперимента ригидность мышей, получавших МФТП или МФТП + этанол, составила $2,6 \pm 0,2$ и $2,3 \pm 0,1$ баллов соответственно (Рис. 2). Использование ФМ-40 в низкой (2%) и высокой (10%) концентрации способствовало снижению ригидности до $1,5 \pm 0,2$ и $1,3 \pm 0,09$ баллов соответственно ($p < 0,05$). На 10-е сутки эксперимента выраженность ригидности животным, которым вводили МФТП или МФТП + этанол, возрастала и соответствовала $2,75 \pm 0,3$ и $2,7 \pm 0,2$ баллам. ФМ-40 в низкой концентрации практически не оказывал влияния на этот показатель ($2,5 \pm 0,3$ балла). В то же время при использовании ФМ-40 в высокой концентрации ригидность снизилась до $1,0 \pm 0,08$ балла ($p < 0,01$).

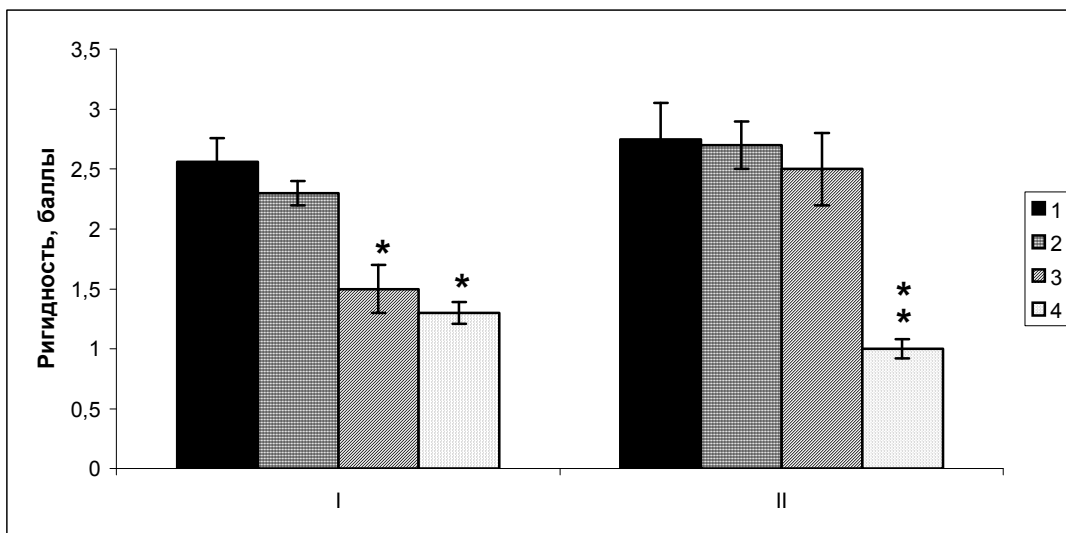


Рис. 2. Влияние Фитомикса-40 при пероральном введении на ригидность (баллы) мышц при МФТП-индуцированном паркинсоническом синдроме после 5 (I) и 10 (II) суток от начала инъекции МФТП. 1 – МФТП+ NaCl; 2 - МФТП + этанол; 3 - МФТП + 2% ФМ-40; 4 -МФТП + 10% ФМ-40. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ в сравнении с группой 2 (МФТП + этанол).

Внутрибрюшинное введение МФТП вызывало существенное снижение содержания дофамина, ГВК и ДОФУК в стриатуме мышей (рис. 3). Хроническое применение 10%-го раствора ФМ-40 увеличивал уровень дофамина в стриатуме в 2,3 раза. Концентрации ДОФУК (показатель внутриклеточного метаболизма дофамина) и ГВК (показатель постсинаптической трансформации дофамина) при использовании 10% раствора Фитомикса-40 возросли соответственно в 2,2 и 3 раза. Более того, 10% раствор снизил содержание серотонина (5-НТ₂) в стриатуме мышей с МФТП-индуцированным ПС. Низкая концентрация препарата не влияла на уровень перечисленных нейромедиаторов и их метаболитов.

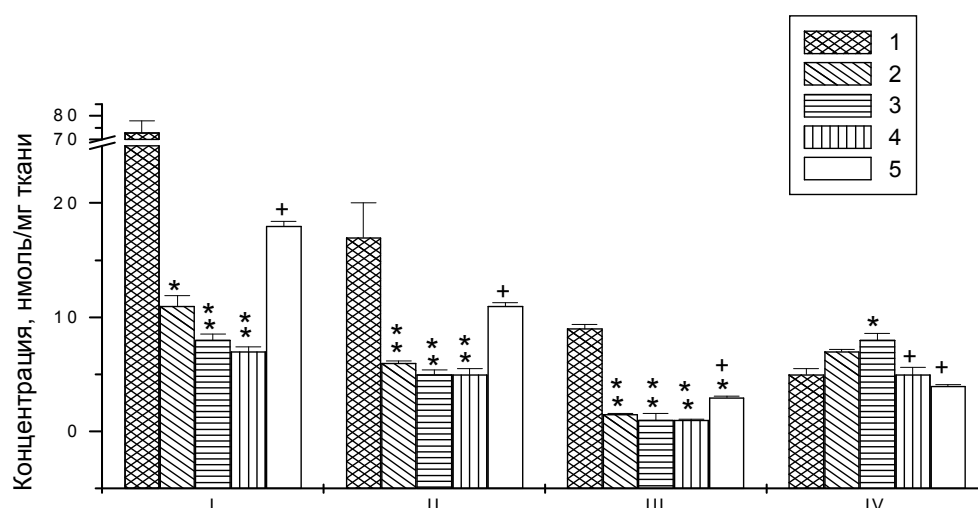


Рис. 3. Влияние Фитомикса-40 на уровень дофамина (I), ДОФУК (II), ГVK (III) и серотонина (IV) в стриатуме мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом после 10 суток от начала инъекции МФТП. 1 – NaCl; 2 – МФТП+ NaCl; 3 – МФТП + этанол; 4 – МФТП + 2% ФМ-40; 5 – МФТП + 10% ФМ-40. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с группой 1; + - $p < 0,05$ в сравнении с группой 3 (МФТП + этанол).

Уровень МДА в стриатуме головного мозга мышей групп 2 и 3 после введения МФТП повысился на 30% по сравнению со здоровыми животными (группа 1). Под воздействием как низкой, так и высокой концентрации ФМ-40 уровень МДА в стриатуме снизился почти до уровня нормы (таблица 1).

Таблица 1. Влияние Фитомикса-40 при пероральном введении на уровень малонового диальдегида в стриатуме мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом.

Группа животных	Условия эксперимента	Уровень МДА (нмоль/мг белка)
1	NaCl	$3,05 \pm 0,05$
2	МФТП+ NaCl	$3,9 \pm 0,03$
3	МФТП + этанол	$4 \pm 0,04$
4	МФТП + 2% ФМ-40	$3,3 \pm 0,04^*$
5	МФТП + 10% ФМ-40	$3,2 \pm 0,03^*$

* – $p < 0,05$ в сравнении с группой 3 (МФТП + этанол)

Результаты опытов *in vitro* на модели индукции ПОЛ аскорбатом железа в гомогенате головного мозга крыс подтвердили антиоксидантный эффект ФМ-40, показанный *in vivo* (рис. 4).

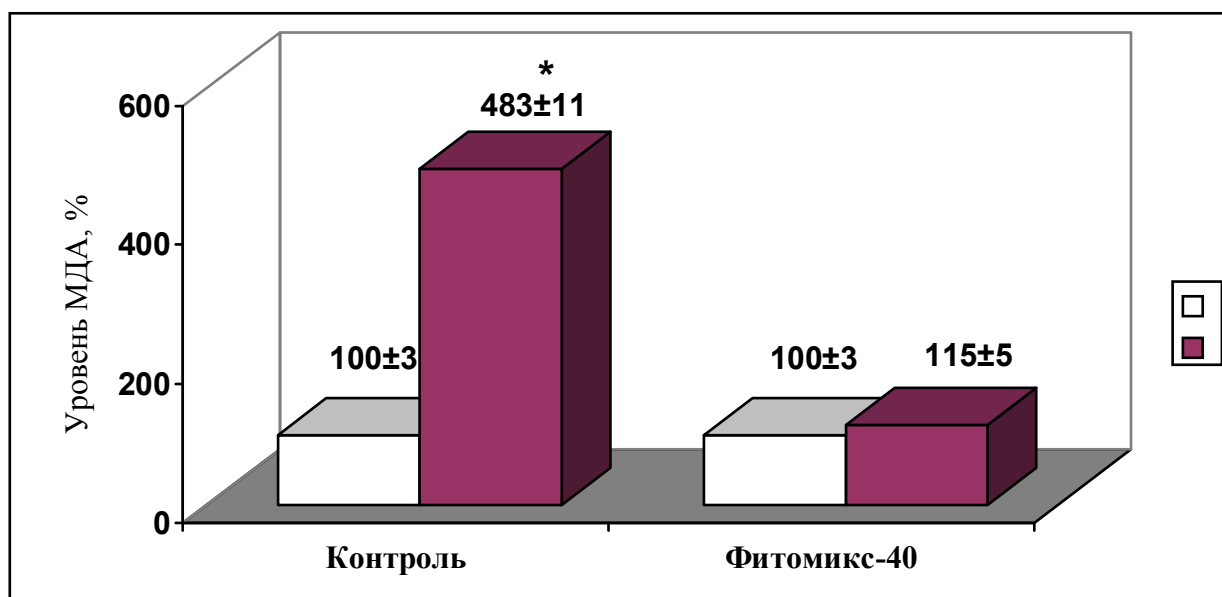


Рис. 4. Влияние Фитомикса-40 на уровень МДА при Fe^{2+} (10^{-5}M)-аскорбат ($2 \times 10^{-4}\text{M}$)-зависимом ПОЛ *in vitro*. 1 - до инкубации гомогената головного мозга мышей; 2 – после инкубации в течение 40 мин.

* - $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

При индукции ПОЛ уровень МДА по сравнению с исходным ($100 \pm 3\%$) увеличился почти в пять раз ($483 \pm 11\%$), тогда как при использовании ФМ-40 практически не отличался ($115 \pm 5\%$) от исходного значения. Антиоксидант мексидол в аналогичных условиях снижал уровень продуктов ПОЛ не более чем в 2 раза.

Таким образом, в опытах на модели МФТП-индуцированного паркинсонизма показано, что курсовое применение ФМ-40 снижает выраженность паркинсонических симптомов – олигокинезии и ригидности. Можно предположить, что ФМ-40 способствует сохранению жизнеспособности и восстановлению функции части пула обратимо поврежденных нигростриатных нейронов. ФМ-40 уменьшает дефицит стриатного дофамина, вероятно, улучшая трофическое обеспечение сохранных нигростриатных нейронов. Такими свойствами обладают компоненты ФМ-40 (в частности сапонины и гинзенозиды женьшеня). Важным аспектом является снижение содержания серотонина в стриатуме мышей с МФТП-индуцированным ПС под действием ФМ-40. Таким

образом ослабляется ключевой нейрохимический механизм паркинсонического синдрома, что приводит к подавлению активности его патофизиологического механизма - генератора патологически усиленного возбуждения, образование которого в стриатуме является патофизиологическим механизмом паркинсонического синдрома [Крыжановский Г.Н. и др., 1989, 2002].

Одним из механизмов антипаркинсонического влияния ФМ-40 может быть его антиоксидантное действие, которое подтверждено в опытах *in vivo* и *in vitro*. Антиоксидантное действие ФМ-40 обусловлено наличием в его составе биологически активных веществ флавоноидной природы, сапонинов, витаминов А, Е, С и др., способных модулировать активность антиоксидантных ферментов на различных этапах детоксикации и, соответственно, влиять на метаболические процессы.

Экспериментальные данные об антипаркинсоническом и антиоксидантном действии ФМ-40 явились основанием для проведения клинических исследований. С учетом выявленной в опытах на животных эффективной концентрации препарата была определена суточная доза приема Фитомикса-40 для человека.

Клинические исследования

Повторные обследования пациентов с БП с интервалом в 3 месяца не выявили достоверных изменений клинических симптомов (таблица 2).

Таблица 2. Оценка состояния больных по показателям шкалы UPDRS до и после применения Фитомикса-40

Разделы шкалы UPDRS	В начале обследования	Через 3 месяца стандартной терапии	Через 3 месяца включения ФМ-40 в терапию
1	2	3	4
Суммарный балл раздела II (нарушение повседневной активности) M +m; p	18,7 ± 1,6	19,2 ± 1,4 p ₂₋₃ = 0,826	14,6 ± 1,1 p₃₋₄ = 0,036
Суммарный балл раздела III (двигательные нарушения) M +m; p	23,3 ± 1,9	23,8 ± 1,9 p ₂₋₃ = 0,631	18,9 ± 1,5 p₃₋₄ = 0,035
Тремор п.20	2,26±0,13	2,2±0,13	1,3±0,16 p₃₋₄ = 0,001
Ригидность п.22	2,2±0,14	2,2±1,14	1,7±1,16 p₃₋₄ = 0,024
Брадикинезия п.31	2,04±0,18	2,0±0,16	1,5±0,18 p₃₋₄ = 0,080

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что применяемая стандартная терапия БП не изменяла тяжесть симптоматики, по крайней мере, в течение 3 месяцев. После введения ФМ-40 в комплекс терапевтических средств суммарный балл оценки нарушений повседневной активности достоверно снизился на 4 балла. Суммарный балл оценки двигательных нарушений также достоверно уменьшился на 4,9 балла. При этом выраженность тремора и ригидности у пациентов с БП достоверно уменьшилась на 0,9 и 0,5 баллов соответственно, то есть на 40 и 22,7% от величины исходного показателя.

Выраженность брадикинезии обнаружила тенденцию к снижению (табл. 2). У пациентов наблюдали снижение выраженности постурального тремора и тремора покоя. Отмечено уменьшение амплитуды дрожания и его периодичности. Пациентам стало легче поддерживать позу, движения становились более четкими. У них нормализовалась речь, письмо, походка. Пациенты субъективно отмечали снижение раздражительности, повышение общего тонуса и работоспособности, улучшение сна. Важно отметить, что применение ФМ-40 не вызывало побочных явлений. Таким образом, использование ФМ-40 на фоне стандартной антипаркинсонической терапии оказало положительный клинический эффект, улучшая качество жизни пациентов, что позволило снизить дозы леводопасодержащих препаратов, длительное применение которых оказывает тяжелый побочный эффект и усугубляет инвалидность больного.

Содержание МДА в крови больных БП при первичном обследовании в 1,6 раза превышало норму и сохранялось на этом уровне, несмотря на проведение стандартной антипаркинсонической терапии (табл. 3). Это может свидетельствовать о преобладании при БП прооксидантных процессов над антиоксидантными. Вместе с тем отмечена сниженная активность супероксиддисмутазы. Выявленные у больных до приема ФМ-40 изменения показателей антиоксидантного статуса в периферической крови согласуются с данными литературы о недостаточности функционирования антиоксидантных и детоксицирующих систем нейрона при БП [Ebadi M. et al., 1996; Jellinger K.A., 1999; Casetta I. et al., 2005]. Применение ФМ-40 приводило к достоверному снижению уровня МДА в крови больных до среднего значения этого показателя ПОЛ у здоровых людей. При этом заметно активизировались СОД, каталаза и глутатионовая антипероксидная система, что свидетельствует о включении антиоксидантных ферментов в детоксикационные процессы организма. Следовательно, есть основания полагать, что одним из механизмов предупреждения гиперактивации ПОЛ у пациентов с БП под влиянием ФМ-40 является активация естественной антиоксидантной защиты.

Таблица 3. Уровень МДА в крови больных БП и показатели антиоксидантного статуса до и после применения Фитомикса-40

Показатели	Норма	Результаты обследования (M±m)		
		В начале обследования	Через 3 месяца стандартной терапии	Через 3 месяца включения ФМ-40 в терапию
1	2	3	4	5
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	4,3±0,1 (3 – 6)	6,8±0,3	6,3±0,4 p ₃₋₄ =0,72	4,2±0,3 p ₄₋₅ < 0,001
Супероксиддисмутаза, Е/ мл мин	420,2±18,5 (380 – 450)	375,1±20,4	411,3±5,2 p ₃₋₄ =0,09	463,3±15,6 p ₄₋₅ = 0,015
Каталаза, Е/ мл мин	32,8±0,9 (20 – 40)	31,3±1,5	31,1±1,5 p ₃₋₄ =0,92	36,1±1,4 p ₄₋₅ = 0,049
Глутатион, мкмоль/л	1,69±0,12 (0,9 – 1,8)	1,39±0,1	1,32±0,1 p ₃₋₄ =0,49	1,78±0,2 p ₄₋₅ = 0,052
Глутатион-S-трансфераза, мкмоль/л·мин	1,37±0,06 (0,9 - 1,7)	1,24±0,1	1,14±0,1 p ₃₋₄ =0,30	1,7±0,1 p ₄₋₅ < 0,001

Таблица 4. Показатели иммунного статуса пациентов с БП до и после применения Фитомикса-40 в комплексной патогенетической терапии

Анти-гены	Норма (%)	Контроль *	Результаты обследования больных (M±m)		
			в начале исследования	Через 3 месяца стандартной терапии	После применения ФМ-40
1	2	3	4	5	6
CD3	60-75	61,1±0,9	51,5±1,6	48,3±2,9	64,5±1,0 p₅₋₆<0,01
CD4	35-46	34,3±0,7	28,0±0,9	26,5±1,8	36,7±0,9 p₅₋₆=0,001
CD8	25-30	30,0±1,5	28,7±1,3	25,2±1,3	25,5±0,8
CD4/ CD8	1,5-1,9	1,2±0,1	1,0±0,1	1,1±0,1	1,5±0,1 p₅₋₆<0,01
CD20	5-15	5,7±0,8	4,3±0,5	4,8±0,5	9,7±0,7 p₅₋₆=0,001
HLA-DR	7-15	7,2±0,5	8,9±1,1	8,4±1,6	11,1±0,8
CD16	10-20	11,4±0,5	15,9±1,5	16,7±2,3	11,0±1,7
CD11b	15-20	11,9±0,8	22,0±3,0	23,0±1,6	15,7±1,9 p₅₋₆=0,001
CD18	56-64	56,8±1,1	84,1±3,7	81,9±3,2	68,6±3,7 p₅₋₆<0,05
CD95	10-30	11,8±0,4	35,4±2,3	35,0±2,5	24,5±3,0 p₅₋₆<0,05
CD25	0-5	3,1±0,4	6,1±1,1	5,4±0,7	2,3±0,5 p₅₋₆<0,01

* Поскольку у женщин не было достоверного различия по сравнению с мужчинами, в качестве контроля представлены результаты первичного обследования пациентов соответствующей возрастной категории с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, но с отсутствием неврологических форм патологий

При исследовании иммунного статуса (таблица 4) в динамике на фоне стандартной антипаркинсонической терапии у пациентов с БП отмечен низкий уровень общего числа Т-лимфоцитов (CD3+), хелперов-индукторов (CD4+), В-лимфоцитов (CD20), клеток с экспрессией HLA-DR антигена, что демонстрирует иммунодепрессию. В то же время завышены относительно соответствующего

контроля остальные показатели, особенно уровень CD11b+, CD18+, CD25+, CD95+ лимфоцитов, что характеризует провоспалительную активацию иммунной системы, которую можно связывать с выявленными при БП процессами воспаления в микроглии головного мозга [Kadiu I. et al., 2005; Arai H. et al., 2006].

Включение ФМ-40 в схему лечения приводило к коррекции показателей иммунного статуса пациентов с БП: увеличилось количество Т- и В-лимфоцитов, снизилось число CD16+, CD11b+, CD18+, CD25+ клеток, что предполагает противовоспалительное действие ФМ-40 (табл. 4).

Полученные данные согласуются с результатами определения содержания ИЛ-6, ФНО- α и ИФН- γ у пациентов до и после применения ФМ-40 (табл. 5).

Таблица 5. Изменение концентрации цитокинов в периферической крови у пациентов с БП в результате курсового приема Фитомикса-40

Цитокины, (пг/мл)	До приема Фитомикса-40 (M \pm m)	После приема Фитомикса-40 (M \pm m)	p
ИЛ-6	39,2 \pm 3,0	7,2 \pm 1,2	0,044
ФНО- α	3,84 \pm 1,77	0,07 \pm 0,03	0,003
ИФН- γ	0,09 \pm 0,04	4,1 \pm 2,3	0,001

p – достоверность различий в группе больных до и после приема Фитомикса-40

При этом выявлены закономерные параллели между изученными параметрами. Повышение концентрации ИФН- γ определено параллельно с нормализацией числа НК-клеток, а также количества клеток с экспрессией CD95 антигена (опосредующего апоптоз) и CD25 антигена (рецептор ИЛ-2). Уменьшение концентрации ИЛ-6 и ФНО- α коррелирует со снижением завышенного количества макрофагов, а также клеток с экспрессией лейкоцитарных интегринов.

Изменение иммунологического статуса у пациентов с БП может быть связано с нарушением дофаминергической регуляции функций иммунной системы, а также

с выявленными при БП процессами воспаления в микроглии головного мозга. В результате, повышенный уровень макрофагов, НК-клеток и лимфоцитов с экспрессией молекул адгезии, а также значительная продукция ИЛ2, ИЛ6 и ФНО- α способствуют процессам апоптоза, вызывающим гибель Т и В лимфоцитов [Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г. и др., 2000]. Применение ФМ-40 приводило к подавлению негативной активации клеток иммунной системы, проявляя иммуномодулирующую, в том числе интерферогенную и противовоспалительную активность препарата.

Таблица 6. Уровень гормона кортизола у пациентов с БП до и после применения Фитомикса-40 в комплексной патогенетической терапии

Гормон	Результаты обследования (M \pm m)		
	В начале исследования	через 3 месяца стандартной терапии	После применения ФМ-40
1	2	3	4
Кортизол, нмоль/л	893,5 \pm 86,3	878,3 \pm 93,4	718,5 \pm 83,8 p₃₋₄ < 0,01
Контроль*, нмоль/л	735,0 \pm 46,0		
Норма, нмоль/л	130,0 – 750,0		

* - в качестве контроля представлены результаты обследования пациентов соответствующей возрастной категории (без БП)

При динамическом обследовании с интервалом 3 месяца на фоне антипаркинсонической терапии уровень кортизола у пациентов с БП находился выше как физиологической нормы, так и возрастного контроля (табл. 6). При включении в схему лечения ФМ-40 концентрации кортизола снизилась до верхних значений интервала нормы. Повышенный уровень кортизола у пациентов с БП, отражающий нарушение гомеостаза при стрессорных состояниях организма и процессах старения, обусловленный также и вторичными нарушениями в связи с токсичностью левадопосодержащих препаратов, согласуется с выраженной

иммунодепрессией в отношении Т- и В-лимфоцитов. ФМ-40, регулируя содержание кортизола, снижал иммунодепрессивное действие глюкокортикоидов и приводил к нормализации иммунологических показателей.

Таким образом, в результате клинико-экспериментальных исследований установлен антипаркинсонический эффект комплексного фитоадаптогенного препарата ФМ-40.

Коррекция клинической симптоматики и нормализация иммунобиологических показателей у пациентов с БП в значительной степени связаны с комплексным характером действия ФМ-40, а именно с его антиоксидантной, гормономодулирующей и иммуномодулирующей, в том числе противовоспалительной и интерферогенной активностью.

Комплексные фармакологические эффекты ФМ-40, вероятно, обусловлены структурной и функциональной связью многих веществ, входящих в состав препарата (панаксозиды, аралозиды, элеутерозиды, салидрозид, схизандрин, урсоловая кислота, олеаноловая кислота, глицирризиновая кислота, бетулин и др.), со стероидами, которые, благодаря своей структуре, имеют множество физиологических активностей. Из литературы известно, что подобные вещества защищают нервные клетки от повреждений, вызывая задержку дегенерации и предупреждая гибель дофаминсинтезирующих нейронов черной субстанции.

Следовательно, комплексный характер действия ФМ-40, обеспечивая сочетанное влияние на патогенетические механизмы и коррекцию разных звеньев патологической системы при БП, вероятно, позволяет потенцировать лечебный эффект и снизить побочное действие используемой терапии, что соответствует принципу КПТ.

Таким образом, проведенное клинико-экспериментальное исследование позволяет рекомендовать фитоадаптоген ФМ-40 для повышения эффективности КПТ болезни Паркинсона.

Проявление антипаркинсонического эффекта комплексного фитоадаптогена при лечении больных открывает новые перспективы комплексной патогенетической терапии БП.

ВЫВОДЫ

1. Комплексный фитоадаптоген Фитомикс-40 при пероральном введении в 10% концентрации ослабляет развитие паркинсонической симптоматики (олигокинезии и ригидности), снижает дефицит дофамина и его метаболитов (ДОФУК и ГВК), а также уменьшает уровень серотонина в стриатуме головного мозга мышей при МФТП-индуцированном паркинсоническом синдроме.
2. У животных с МФТП-индуцированным паркинсонизмом Фитомикс-40 снижает содержание токсического продукта ПОЛ - малонового диальдегида в стриатуме.
3. У пациентов с болезнью Паркинсона при стандартной антипаркинсонической терапии в крови определено снижение числа CD3+, CD4+, CD20+, лимфоцитов, повышенное содержание CD16+, CD11b+, CD18+, CD25+, CD95+лимфоцитов; повышение уровня гормона кортизола, малонового диальдегида, снижение активности ферментов антиоксидантной системы.
4. Применение Фитомикса-40 на фоне стандартного антипаркинсонического лечения вызывает коррекцию иммунологических показателей пациентов с болезнью Паркинсона: восстановление (увеличение) числа Т-клеток, иммунорегуляторного индекса, числа В-клеток; нормализацию (снижение) числа макрофагов, натуральных киллеров, числа клеток с экспрессией CD95 антигена, опосредующего апоптоз, CD25 антигена и лейкоцитарных молекул адгезии, а также снижение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ФНО- α , рост содержания ИФН- γ и снижение уровня гормона кортизола.
5. У пациентов с болезнью Паркинсона, принимавших ФМ-40 в комплексе с препаратами стандартной терапии, выявлена активация системы естественной антиоксидантной защиты: повышение уровня глутатиона, увеличение активности супреоксид-дисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы, а также снижение уровня малонового диальдегида в крови.
6. Коррекция патогенетических механизмов при использовании Фитомикса-40 у мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом и у

пациентов с болезнью Паркинсона выявляет антипаркинсоническую активность препарата.

7. Фитомикс-40 повышает эффективность комплексной патогенетической терапии (КПТ) болезни Паркинсона - снижает тяжесть дрожательно-ригидной и ригидно-дрожательной формы заболевания, что существенно улучшает качество жизни больных.
8. Комплексный фитоадоптоген Фитомикс-40 может быть рекомендован для включения в КПТ болезни Паркинсона.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Голубева В.А., Касаткина Н.Н., Куринная О.Н., **Бочаров Е.В.** Токсикологическое изучение препарата Фитомикс-40 // Гигиена и санитария. – 1999. - №5. - С. 60-63.
2. Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., Voronina T.A., Nerobkova L.N., Kudrin V.S., **Bocharov E.V.** Anti-parkinsonian activity of mexidol // Pharmaceutical Journal of Slovenia. - 2003. – Vol. 54. – P. 547-548.
3. **Bocharov E.V.**, Kucheryanu V.G, Kryzhanovsky G.N., Bocharova O.A., Карпова Р.В. Fitomix-40 prevents development of experimental parkinsonian syndrome // European J. Neurology. –2004. – Vol. 11, Supl. 2.- P.260.
4. Магаева С.В., Кучеряну В.Г., **Бочаров Е.В.** Дизрегуляция нейротрансмиттерных и нейропептидных систем при паркинсонизме // Тез. докл. 2-го Украинского симпозиума по паркинсонизму - Киев. - 2004. - С. 50.
5. **Бочаров Е.В.**, Крыжановский Г.Н., Бочарова О.А., Кучеряну В.Г., Кудрин В.С. Фитомикс-40 препятствует развитию экспериментального паркинсонизма. Тез. докл. 3-го Российского конгресса по патофизиологии с международным участием. - М. - 2004. – С. 7.
6. Kucheryanu V.G., **Bocharov E.V.**, Kryzhanovsky G.N., Bocharova O.A., Ivanova-Smolenskaya I.A., Poleschuk V.V., Kudrin V.S. Neuroprotective effect of Fitomix-40 in experimental parkinsonian syndrome // Eur. Neuropsychopharmacology. - 2005. - Vol. 15, Suppl. 2. - P. S212.
7. **Бочаров Е.В.**, Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н., Бочарова О.А., Кудрин В.С., Белорусцева С.А. Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 2006. - Т. 141, №5. - С.555-558.
8. **Бочаров Е.В.**, Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н., Бочарова О.А., Иванова-Смоленская И.А., Полещук В.В. Коррекция иммунологических показателей фитоадаптогеном Фитомикс-40 при болезни Паркинсона // Патогенез. - 2006. – Т. 4, № 1. – С. 39.
9. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Шейченко В.И., Толкачев О.Н., **Бочаров Е.В.**, Казеев И.В., Быков В.А. Применение разностных электронных спектров поглощения в анализе комплексного препарата Фитомикс-40 // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 51.
10. Шейченко В.И., Бочарова О.А., Шейченко О.П., **Бочаров Е.В.**, Быков В.А. ЯМР анализ компонентов препарата ФИТОМИКС-40 // Сборник научных трудов ВИЛАР. - М. - 2006. - Т. 17. - С.25-39.

11. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Шейченко В.И., Толкачев О.Н., **Бочаров Е.В.**, Казеев И.В., Быков В.А. Электронные спектры поглощения в анализе комплексного препарата "Фитомикс-40" // Сборник научных трудов ВИЛАР. – М. - 2006. - Т. 17. - С. 40-47.
12. Шейченко В.И., Бочарова О.А., Шейченко О.П., **Бочаров Е.В.**, Барышников А.Ю., Быков В.А. Аналитические возможности метода ЯМР для определения компонентов препарата Фитомикс-40 // Заводская лаборатория. Диагностика материалов – 2006. – Т. 72, № 8. – С. 15-23.
13. **Bocharov E.V.**, Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., Bocharova O.A., Ivanova-Smolenskaya I.A., Poleschuk V.V. Immune and hormonal status disturbance in Parkinson's disease // Chinese J. of Pathophysiology. – 2006. – Vol. 22., No 13.- P. 438.