

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦЕРЕБРОЛИЗИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ГЕМОМРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Н. С. Косицын, М. М. Свинов, Е. В. Голобородько,
С. В. Божевалова, А. М. Яблонская¹

В опытах на белых крысах на модели одностороннего геморагического инсульта исследована фармакологическая эффективность церебролизина. Показано, что церебролизин оказывает нейропротекторный эффект, что выражается в уменьшении количества дегенерирующих нейронов вблизи гематомы в острый период и уменьшении количества погибших нейронов на ранней стадии восстановления после инсульта. Применение препарата приводит к улучшению функционального состояния животных по показателям неврологического и поведенческого тестирования. Уменьшение гиперактивности в тесте “открытое поле” и сохранность латентного периода избегания в тесте на пассивное избегание свидетельствует о том, что препарат влияет на сохранность тормозных процессов, нарушенных при инсульте мозга.

Ключевые слова: экспериментальный геморагический инсульт, церебролизин, экспериментальная фармакотерапия инсульта, нейропротекция, неврологическое и поведенческое тестирование

ВВЕДЕНИЕ

Церебролизин является ноотропным препаратом, который состоит из смеси свободных аминокислот и низкомолекулярных пептидов и обладает нейротрофической активностью. Он способствует функциональному улучшению в клинике при ишемическом инсульте, болезни Альцгеймера [9, 13] и оказывает нейропротекторное действие при моделировании нейродегенеративных изменений в лабораторных условиях [7, 8, 11].

Однако, если его эффективность при ишемическом инсульте подробно изучена [1 – 3, 6], работы по эффективности его применения в случае геморагического инсульта практически отсутствуют. Настоящая работа представляет структурно-функциональное исследование эффективности применения церебролизина при экспериментальном геморагическом инсульте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Геморагический инсульт моделировали унилатерально в области левого стриатума с координатами ($H = 3,5; 4,5; 5,5$ мм, $L = 3,5$ мм, $A = -0,3$ мм) по атласу [10]. Применяли два метода моделирования геморагического инсульта: по G. A. Rosenberг и соавт. [12] путем введения смеси коллагеназы и гепарина и по методу, разработанному в нашей лаборатории, за счет механического повреждения сосудов [4], но без введения аутокрови, что приводило к созданию гематомы малого объема. Проведено две серии экспериментов: острая серия, в которой материал забирали на морфологический анализ через 24 ч после

геморагического инсульта, и хроническая, которая включала неврологический и поведенческий скрининг и морфологический анализ в конце эксперимента (28 дней).

Животных при всех оперативных вмешательствах наркотизировали смесью кетамина (86 мг/кг) и ксилазина (рометар, 10 мг/кг).

Острый эксперимент. Исследование проводили на 21 крысе, геморагический инсульт моделировали путем введения смеси коллагеназы и гепарина [12]. Семи крысам после воспроизведения геморагического инсульта вводили плацебо (0,9 % NaCl). Второй группе вводили церебролизин (2,5 мл/кг) через 4 ч после воспроизведения инсульта. Третьей группе церебролизин вводили 4 дня до (2,5 мл/кг) и спустя 4 ч после моделирования геморагического инсульта.

Хронический эксперимент. Исследование проводили на 28 крысах. Семь крыс были ложнооперированными и получали в течение 10 дней после операции плацебо. У 7 крыс воспроизводили геморагический инсульт, они получали в течение 10 дней плацебо. У двух других групп по 7 крыс в каждой был воспроизведен геморагический инсульт по двум вышеописанным методикам, они получали в течение 10 дней 1 мл/кг церебролизина. Введение церебролизина (“Ebewe”, Австрия) и плацебо производили внутрибрюшинно.

Морфология. Оценку объема инсультного повреждения, степени нейродегенеративных процессов и контроль топологии очага внутримозговой гематомы проводили по фронтальным срезам мозга. Каждая крыса была анестезирована и перфузирована через левый желудочек последовательно 1,5 и 4 % раствором параформальдегида на 0,15 М фосфатном буфере (pH 7,4). Мозг оставляли в скальпе на 24 ч после перфузии в хо-

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, 117845, ул. Бутлерова, 5а.

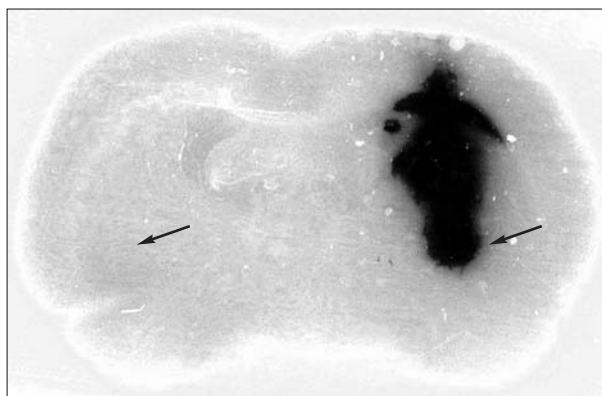


Рис. 1. Внешний вид гематомы через 24 ч после моделирования геморрагического инсульта путем введения коллагеназы на неокрашенном срезе мозга, залитого в парапласт. Стрелками указаны области морфологического анализа в стриатуме.

лодильнике при температуре 4 °С. После этого мозг обезвоживали, заливали в парапласт и делали срезы на микротоме Historange (LKB, Швеция) толщиной 6 мкм с шагом 200 мкм, после чего окрашивали по методу Ниссля. Морфологическую картину отцифровывали на морфометрической установке Axoplan 2 (“Zeiss”, Германия), затем реконструировали и вычисляли объем инсультного повреждения и осуществляли подсчет нейронов с использованием программы KS-300 (“Zeiss”, Германия) и Image-Pro Plus 3.

Подсчет количества нормальных нейронов среднего и большого размера проводили вблизи гематомы и в симметричной области на противоположной стороне (рис. 1). После этого вычисляли разность количества таких нейронов в этих двух областях в процентах по М. R. Del Bigio и соавт. [5]. Таким образом, это отличие является показателем относительной клеточной гибели нейронов стриатума в области, прилегающей к гематоме, через 28 дней после моделирования инсульта. В острой фазе этот коэффициент показывает преи-

мущественно относительное количество дегенерирующих (гиперхромных) нейронов.

Неврологическое и поведенческое тестирование. Набор поведенческих тестов включал тесты: “открытое поле” (исследование двигательной и ориентировочно-исследовательской активности), на тонкие манипуляционные движения (крыса доставала семечки из кормушки через узко расставленные прутья решетки по I. Q. Whishaw и соавт. [14]), пассивное избегание (тест на сохранность тормозных процессов). Поведенческое тестирование проводили с 21-го дня до и с 2-го по 28-й день после моделирования геморрагического инсульта.

Неврологический дефицит определяли в тесте поворота на наклонной плоскости, ходьбы по бревну, растопыривания пальцев конечностей на плоскости, по латентности падения из положения виса на турнике и вычисляли коэффициент по G. A. Rosenberg и соавт. [12], в модификации.

Полученные поведенческие и морфологические данные были сведены в электронные таблицы Excel. Статистический анализ данных по поведению и по подсчету нейронов с использованием программы Statistica 6.0 производили по методу ANOVA Краскела-Уоллиса. Последующий анализ заключался в попарном сравнении данных по U-тесту Манна-Уитни с применением поправки Бонферрони при оценке значения вероятности. На графиках представлены среднеквадратические отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические исследования

Объем гематомы. По объему гематомы не было выявлено различий между группами с введением и без введения церебролизина, как через 24 ч, так и через 4 недели после моделирования геморрагического инсульта. Среднее значение объема гематомы у крыс с коллагеназной моделью составляло $15,25 \pm 7,38 \text{ мм}^3$, а у

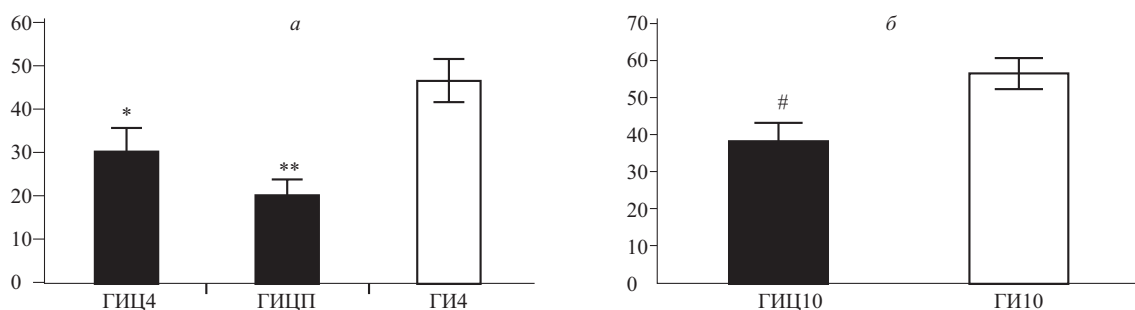


Рис. 2. Подсчет плотности нейронов в области, прилегающей к гематоме (коллагеназная модель геморрагического инсульта).

а: Относительное количество дегенерирующих нейронов (в %) вблизи гематомы через 24 ч после моделирования инсульта. GIЦ4 — группа животных, которым вводили церебролизин через 4 ч после моделирования инсульта (* — $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой GI4). GIЦП — группа животных, которым вводили церебролизин в течение 4 дней до и через 4 ч после моделирования инсульта (** — $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой GI4). GI4 — контрольная группа животных, которым через 4 ч после моделирования инсульта вводили плацебо.

б: Относительное количество погибших нейронов (в %) вблизи гематомы через 28 дней после моделирования инсульта. Здесь и на рис. 3 GIЦ10 — группа животных, которым вводили церебролизин через 4 ч и в течение последующих 10 дней после моделирования инсульта (# — $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой GI10). GI10 — контрольная группа животных, которым через 4 ч и в течение последующих 10 дней после моделирования инсульта вводили плацебо.

крыс с моделью механического повреждения сосудов — $2,04 \pm 1,05 \text{ мм}^3$.

Подсчет количества нейронов. В острый период после моделирования инсульта было обнаружено статистически значимое различие между контрольной группой и двумя группами, которые получали церебролизин, при подсчете количества нейронов. Относительное количество дегенерирующих нейронов было больше у животных с экспериментальным геморрагическим инсультом, которые получали плацебо (рис. 2, а). Наиболее выраженный эффект нейропротекции наблюдали в группе животных, которым церебролизин вводили до моделирования инсульта. Однако даже разовое введение препарата через 4 ч после моделирования геморрагического инсульта давало положительный нейропротекторный эффект (рис. 2, а).

Относительная нейрональная гибель вблизи гематомы была статистически значимо меньше через 28 дней после моделирования инсульта путем введения коллагеназы при хроническом введении церебролизина по сравнению с таковой у животных, получавших плацебо (рис. 2, б). Относительная клеточная гибель вблизи гематомы была также меньше у животных, получавших церебролизин, при моделировании инсульта путем механического повреждения сосудов. Но эта разница не была статистически значимой.

Неврологическое и поведенческое тестирование

Неврологический дефицит, возникавший у животных после моделирования геморрагического инсульта путем введения коллагеназы, снижался быстрее у группы животных, получавших церебролизин, по сравнению с животными, получавшими плацебо. Явных неврологических нарушений у животных с моделью механического повреждения сосудов не наблюдалось ввиду того, что объем гематомы был незначителен.

При разных способах моделирования геморрагического инсульта в обоих моделях у групп животных, получавших церебролизин, наблюдалось выраженное улучшение в поведении по сравнению с животными, получавшими плацебо.

Несмотря на то, что у животных с моделью инсульта путем механического повреждения сосудов неврологический дефицит был не выражен, у них, как и у животных с коллагеназной моделью, наблюдали значительные нарушения в тестах “открытое поле”, на тонкие манипуляционные движения, пассивного избегания. В тесте “открытое поле” это выражалось в уменьшении двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в начальный период с последующим возрастанием и гиперактивностью у инсультной группы, получавшей плацебо (рис. 3, а). У этой группы не происходило восстановления такого показателя, как отношение результативных ко всем движениям в тесте на тонкие манипуляционные движения (рис. 3, б). Уменьшение этого показателя указывает на

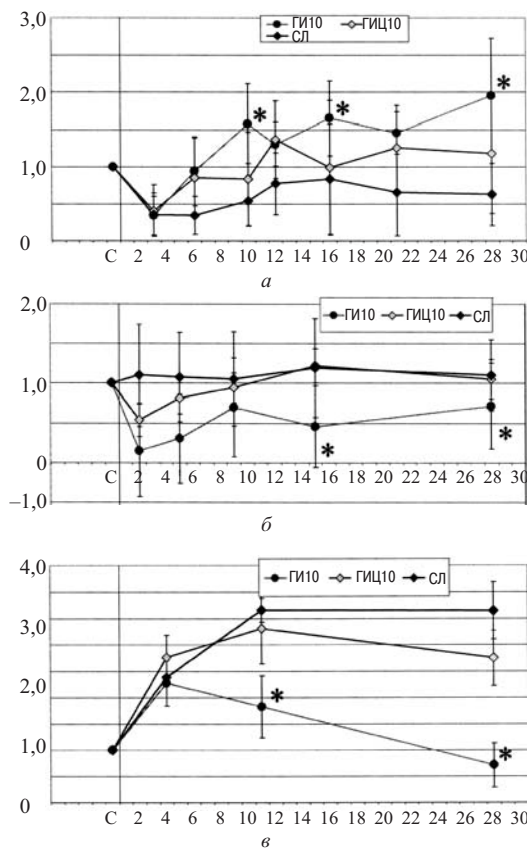


Рис. 3. Динамика поведенческой активности в послеоперационный период (моделирование геморрагического инсульта путем механического повреждения сосудов).

а — Количество пересеченных квадратов (динамика двигательной и ориентировочно-исследовательской активности) в тесте “открытое поле”. б — Отношение результативных ко всем (включая результативные и нерезультативные) движениям в тесте на тонкие манипуляционные движения. в — Латентный период в тесте пассивного избегания. По оси ординат — нормированные к предоперационным постоперационные значения поведенческой активности; по оси абсцисс — дни после операции (С — до операции). В легенде обозначены группы животных. СЛ — контрольная группа (ложнооперированные животные, получавшие плацебо). Остальные обозначения, те же, что на рис. 2. * — статистически значимое различие между группами GI10 и GIЦ10, $p < 0,05$.

ухудшение манипуляционных навыков. Латентный период рефлекса избегания у групп, получавшей и не получавшей церебролизин, увеличивался в начальный период после моделирования инсульта (данный рефлекс не вырабатывался на в 100 % случаев до моделирования инсульта и, следовательно, продолжался процесс обучения). В дальнейшем этот показатель резко снижался в группе, не получавшей препарата, что свидетельствует о нарушении у них тормозных процессов (рис. 3, в).

Как видно из рис. 3 применение церебролизина приводит к улучшению всех перечисленных показателей: восстанавливаются манипуляционные навыки в тесте на тонкие манипуляционные движения, уменьшается гиперактивность в тесте “открытое поле”, сохраняется латентный период избегания в тесте на пассивное избегание. Воздействие на два последних пока-

зателя поведения говорит о том, что препарат влияет на сохранность тормозных процессов, нарушенных при инсульте.

Таким образом, на модели унилатерального геморагического инсульта показано, что церебролизин оказывает нейропротекторный эффект, улучшает функциональное состояние животных по показателям неврологического и поведенческого тестирования.

ВЫВОДЫ

1. Церебролизин оказывает нейропротекторный эффект в острую фазу экспериментального геморрагического инсульта, что выражается в уменьшении количества дегенерирующих нейронов вокруг гематомы через 24 ч после моделирования инсульта. Нейропротекторный эффект препарата выявлен спустя 28 дней после моделирования инсульта при длительном (ежедневно, в течение первых 10 дней) введении препарата.

2. Церебролизин улучшает функциональное состояние животных по показателям неврологического и поведенческого тестирования: уменьшается гиперактивность в тесте “открытое поле”, сохраняется латентный период избегания в тесте на пассивное избегание, что свидетельствует о том, что препарат влияет на сохранность тормозных процессов, нарушенных при инсульте мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Б. С. Виленский, Г. М. Семенова, Е. А. Широков, *Ж. невропатол. и психиатр.*, № 99, 65 – 69 (1999).
2. Б. С. Виленский, М. М. Одинак, Е. А. Широков и др., *Ж. невропатол. и психиатр.*, № 100, 31 – 34 (2000).
3. Е. И. Гусев, Г. С. Бэрд, А. Б. Гехт и др., *Ж. невропатол. и психиатр.*, № 94, 9 – 13 (1994).
4. А. Н. Макаренко, Н. С. Косицын, Н. В. Пасикова, М. М. Свинов, *ЖВНД*, № 52, 765 – 768 (2002).
5. M. R. Del Bigio, H. J. Yan, R. Buist, and J. Peeling, *Stroke*, № 27, 2312 – 2320 (1996).
6. T. Domzal and B. Zaleska, *Neurol. Neurochir. Pol.*, № 29, 325 – 331 (1995).
7. B. Gutmann, B. Hutter-Paier, G. Skofitsch, et al., *Neurotox. Res.*, № 4, 59 – 65 (2002).
8. P. Haninec, L. Houst'ava, L. Stejskal, and P. Dubovy, *Ann. Anat.*, № 185, 233 – 238 (2003).
9. M. Panisset, S. Gauthier, H. Moessler, and M. Windisch, *J. Neural Transm.*, № 109, 1089 – 1104 (2002).
10. G. Paxinos and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Acad. Press, Sydney (1982).
11. E. Rockenstein, A. Adame, M. Mante, et al., *J. Neural Transm.*, № 110, 1313 – 1327 (2003).
12. G. A. Rosenberg, S. Mun-Bryce, M. Wesley, and M. Kornfeld, *Stroke*, № 21, 801 – 807 (1990).
13. E. Ruether, X. A. Alvarez, M. Rainer, and H. Moessler, *J. Neural Transm. Suppl.*, 265 – 275 (2002).
14. I. Q. Whishaw, W. T. O'Connor, and S. B. Dunnett, *Brain*, № 109, 805 – 843 (1986).

Поступила 19.01.06

EFFICACY OF CEREBROLYSIN IN CEREBRAL HEMORRHAGE MODEL IN RATS

N. S. Kositsyn, M. M. Svinov, E. V. Goloborod'ko, S. V. Bozhevalova, and A. M. Yablonskaya

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117845, Russia

The pharmacological efficacy of cerebrolysin (a brain-derived peptidergic drug) was studied in rats with a unilateral hemorrhagic stroke model. Cerebrolysin produces a neuroprotective effect, which is manifested by a decrease in the number of degenerated neurons in the vicinity of hematoma region in acute period and by a reduction of the neuronal loss in the early recovery phase. Besides, the administration of cerebrolysin improves the functional state as judged from the results of neurological and behavioral tests (open field, paw licking, and passive avoidance). A decrease in the hyperactivity in the open field test and the conservation of latent avoidance in the passive avoidance test demonstrate the drug influence on the maintenance of inhibitory processes deteriorated in stroke.