

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ФЕНИЛ-Т-БУТИЛНИТРОНА, МЕКСИДОЛА И НООГЛЮТИЛА НА ЗОНУ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ МОЗГА И ПАМЯТЬ КРЫС ПОСЛЕ ОККЛЮЗИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ

О. В. Поварова¹, Т. Л. Гарибова², Е. И. Каленикова¹, И. П. Галаева²,
В. А. Крайнева², О. С. Медведев¹, Т. А. Воронина²

У крыс с окклюзией дистальной ветви левой средней мозговой артерии (ОСМА) через 72 ч после операции на фронтальных срезах головного мозга в лобно-теменной области коры определялась зона ишемического поражения размером $22,51 \pm 3,0$ % от объема ипсилатерального полушария. Нооглютил (N-(5-оксиникотиноил)-L-глутаминовая кислота) в дозе 10 мг/кг, мексидол в дозе 100 мг/кг и фенил-*t*-бутилнитрона (PBN) в дозе 100 мг/кг при введении в вену в момент ОСМА, а в последующие 2 дня внутрибрюшинно эффективно ограничивали зону поражения: нооглютил — до $7,6 \pm 2,28$ %, мексидол — до $9,55 \pm 1,9$ % и PBN — до $12,8 \pm 1,7$ % от объема ипсилатерального полушария. У животных обученных условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) до ОСМА на третьи сутки после операции отмечалось нарушение воспроизведения рефлекса. На фоне мексидола и, особенно, нооглютила нарушения воспроизведения УРПИ были выражены в значительно меньшей степени.

Ключевые слова: окклюзия ветви средней мозговой артерии, зона поражения, нейрпротекция, память, мексидол, нооглютил, фенил-*t*-бутилнитрон

ВВЕДЕНИЕ

Ишемический инсульт занимает важное место в структуре цереброваскулярных заболеваний и является одной из главных причин смертности и инвалидизации взрослого населения. У больных, перенесших инсульт, помимо неврологического дефицита развивается депрессия, нарушение когнитивных функций [22].

При ишемическом поражении мозга в результате снижения мозгового кровотока происходит нарушение функции дыхательной цепи митохондрий, энергетического обмена ионного гомеостаза клетки с повышением внутриклеточного содержания ионов кальция, глутаматной “эксайтотоксичностью”, активацией внутриклеточных ферментов, повышением синтеза NO, развитием оксидативного стресса, экспрессией генов, аноксической деполяризацией мембран и смертью клетки [3, 12, 20].

В настоящее время активно проводится поиск новых нейропротекторов среди веществ, воздействующих на глутаматергическую систему, антагонистов кальция и оксида азота, антиоксидантов [7, 9, 19]. Для этих целей используется одна из наиболее адекватных экспериментальных моделей ишемического инсульта

— модель локальной ишемии головного мозга у крыс путем окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) [10, 11, 19].

Целью настоящего исследования явилось изучение нейропротективных свойств ноотропного препарата, позитивного модулятора AMPA рецепторов глутаматергической системы нооглютила (N-(5-оксиникотиноил)-L-глутаминовая кислота), препарата с анксиолитической и нейропротективной активностью антиоксиданта и мембранопротектора мексидола [3] и находящегося на стадии доклинического исследования, антиоксиданта, относящегося к группе “ловушек” свободных радикалов — фенил-*t*-бутилнитрона (PBN) [14, 15, 17, 18, 25] на модели ишемического инсульта, вызванного ОСМА у крыс, а также изучение у этих животных процессов обучения и памяти.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар 4–5-месячного возраста массой 300–350 г. Моделирование фокальной ишемии головного мозга проводили согласно методике Chen [11]. У наркотизированных этаминалом натрия животных (50 мг/кг, в/б), в месте шва скуловой кости с лобной делали отверстие диаметром около двух миллиметров, обнажая место пересечения средней мозговой артерии с нижней мозговой веной. Под микроскопом (Olympus SZ-CTV) под левую среднюю мозговую артерию подводили специальный металлический крючок. С помо-

¹ Факультет фундаментальной медицины, кафедра фармакологии (зав. — проф. О. С. Медведев) МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 119192, Ломоносовский пр., 31/5.

² Лаборатория психофармакологии (зав. — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

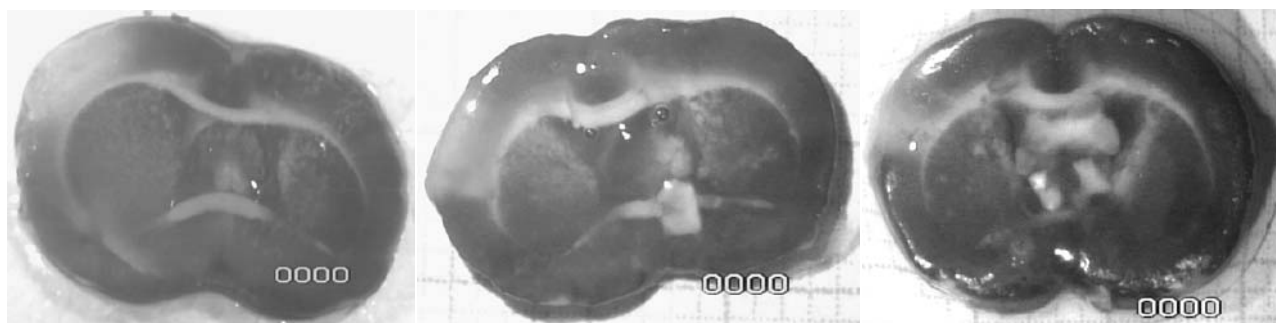


Рис. 1. Срезы головного мозга крыс с окклюзией средней мозговой артерии.

щью коагулятора производили окклюзию средней мозговой артерии проксимальнее места ее бифуркации на фронтальную и париетальную ветви. При этом в поле зрения микроскопа наблюдалось прекращение тока крови по средней мозговой артерии выше места окклюзии. В группе ложнооперированных животных осуществлялась описанная выше процедура операции без ОСМА.

Для изучения процессов обучения и памяти за 30 мин до операции животных обучали условной реакции пассивного избегания (УРПИ) в установке фирмы “Lafayette Instrument Co” (США), а через 70 ч после ОСМА воспроизводили рефлекс [2, 5]. Через 72 ч после ОСМА животных декапитировали, извлекали головной мозг и определяли объем инфаркта методом гистохимического окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ) [8]. Затем для каждого окрашенного среза проводили двустороннее фотографирование цветной видеокамерой CCD IRIS (модель DXC-107AP, SONY Corporation). С помощью программы МОСНА (Copyright© Jandel Scientific Corp., 1991 – 1992, версия 1.2.0.0) проводили планиметрию, определяли площадь ипсилатерального полушария (ИП) и зоны поражения (ЗП). Вычисляли объем ЗП и ИП по формуле “трапеции”: $V = d [1/2[S_1 + S_n] + S_2 + \dots + S_i + \dots + S_{n-1}]$, где d — толщина среза, S_1, S_n, S_{n-1} — площадь ЗП и ИП для каждого среза, с последующим определением процента объема ЗП относительно объема ИП (J. M. Roda, 1995).

В эксперименте было использовано 51 животное, случайным образом разделенные на 6 групп: 1-я группа ($n = 10$) — интактные животные; 2-я группа ($n = 10$) — ложнооперированные; 3-я группа ($n = 8$) — контрольные с ОСМА; 4-я группа — животные ($n = 8$) с ОСМА + нооглютил 10 мг/кг/день; 5-я группа — животные ($n = 8$) с ОСМА + мексидол 100 мг/кг/день; 6-я группа — животные ($n = 7$) с ОСМА + фенил-*t*-бутилнитрон (“Sigma”) 100 мг/кг/день. Нооглютил, мексидол, PBN или физиологический раствор вводили крысам в момент ОСМА в/в, а в последующие два дня в/б.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета статистических программ “STATISTICA 4.0”(Statistica Inc., США). Данные пред-

ставлены в виде: среднее арифметическое \pm ошибка среднего. Для межгруппового сравнения применяли критерий Даннета, и U-критерий Манна-Уитни. Различия рассматривались как статистически значимые при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологический анализ срезов головного мозга крыс с ОСМА проведенный через 72 ч показал, что у животных отмечалось формирование зоны инфаркта. Применение метаболического красителя (2.3.5-трифенилтетразолий хлорид) позволило легко отличить зону инфаркта от здоровой ткани. Механизм прокрашивания связан с тем, что ТТХ (белый порошок) в здоровой ткани, взаимодействуя с компонентами митохондриальной дыхательной цепи, восстанавливается до формазана и окрашивает в красный цвет только неповрежденную ткань (J. V. Bederson, 1986). В черно-белом варианте фотографии (рис. 1) на фронтальных срезах головного мозга крыс зона поражения выглядит более светлой в сравнении с неповрежденной тканью. Видно, что при ОСМА поражена лобнотемная область коры головного мозга (рис. 1). Расчет объема зоны поражения показал, что в среднем он составил $22,51 \pm 3\%$ от общего объема ипсилатерального полушария. Эти результаты (локализация и зона поражения) соответствуют данным, полученным другими авторами на модели ОСМА у крыс [10, 11, 16, 19, 21, 23].

В группах животных, получавших нооглютил, мексидол или PBN отмечалось значительное уменьшение зоны ишемического поражения. Особенно эффективным был нооглютил. На его фоне объем ишемического поражения мозга был в 3 раза меньше, чем в контроле и составил $7,6 \pm 2,28\%$ ($p \leq 0,05$) от объема ипсилатерального полушария. Под влиянием мексидола этот показатель составлял $9,55 \pm 1,9\%$ ($p \leq 0,05$), а на фоне PBN — $12,8 \pm 1,7\%$ ($p \leq 0,05$).

Воспроизведение УРПИ, проведенное через трое суток после обучения и операции, показало, что ложнооперированные крысы вели себя как интактные животные — помнили об ударе током в темной камере и не заходили туда или заходили с большим латентным временем рефлекса (рис. 2). Тестирование животных с

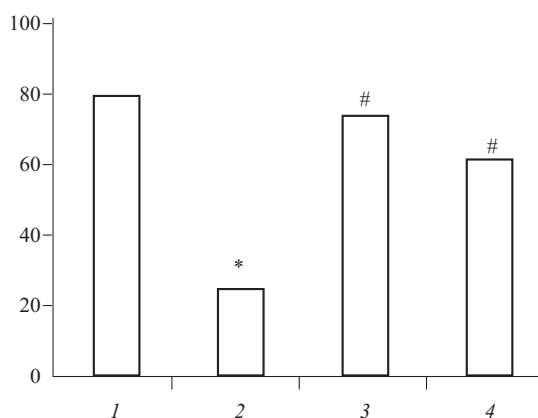


Рис. 2. Влияние нооглютила и мексидола на воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) у крыс с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА).

По оси ординат — количество животных, %, не зашедших в темную камеру при воспроизведении УРПИ: 1 — ложнооперированные животные, 2 — крысы с ОСМА, 3 — крысы с ОСМА + нооглютил (10 мг/кг), 4 — крысы с ОСМА + мексидол (100 мг/кг). Отличия достоверны между ложнооперированными животными и крысами с ОСМА при $p \leq 0,05$; # — между крысами с ОСМА и группой крыс с ОСМА, получавшей препарат.

ОСМА выявило у них нарушение воспроизведения памятного следа. Почти все крысы с ОСМА быстро заходили в темную “опасную” камеру. Мексидол и особенно нооглютил ослабляли амнезию УРПИ, вызванную ОСМА, статистически достоверно увеличивая латентное время рефлекса при воспроизведении (рис. 2).

Таким образом, нооглютил, мексидол и PBN уменьшали в мозге крыс зону ишемического поражения, вызванную ОСМА, а нооглютил и мексидол улучшали процессы воспроизведения памятного следа.

Как отмечалось выше, наиболее эффективным церебропротектором среди изученных соединений был нооглютил. Патогенез ишемического инсульта сложен, основу его составляет патофизиохимические реакции глутаматно-кальциевого каскада, который можно условно разделить на несколько последовательных этапов [3, 12, 20], каждый из которых представляет собой потенциальную мишень для терапевтического воздействия. Ранее было показано, что нооглютил обладает противогипоксическим эффектом [1], улучшает мозговой кровоток, ограничивает скорость развития, выраженность отека и набухания мозговой ткани при транзиторной ишемии и экспериментальной черепно-мозговой травме. Нооглютил вызывает также усиление возбуждающего постсинаптического потенциала, генерируемого AMPA, с последующим уменьшением десенситизации AMPA рецептора, которая приводит к замедлению деактивации AMPA рецептора [1, 4], усиливает долговременную потенциацию в синапсах перфорантного пути на нейронах зубчатой извилины в срезах гиппокампа. Являясь позитивным модулятором AMPA рецепторов глутаматергической системы, нооглютил, по-видимому, способствует активации нейрональных процессов в ишемизированной зоне и

препятствует развитию патологических процессов, приводящих к нарушению воспроизведения памятного следа.

В последнее время большое внимание уделяется коррекции оксидативного стресса, как одного из главных компонентов ишемического патогенетического каскада [1, 3, 13]. Показано, что наблюдаемая при ишемии гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) может быть устранена применением препаратов с антиоксидантной активностью [13]. В частности, антиоксиданты, являющиеся “ловушками” свободных радикалов (S-аллилцистеин, MI-186), оказывают выраженный нейропротективный эффект [16, 21].

Эффективность PBN, как нейропротектора, обусловлена, по-видимому, его прямым взаимодействием с активными формами кислорода [25], стабилизирующим влиянием на митохондриальную дисфункцию [15, 18], способностью уменьшать синтез NO и провоспалительных факторов [17], блокировать кальциевые каналы [6].

Механизм нейропротективного действия мексидола в значительной степени обусловлен его антиоксидантными свойствами [2] и связан со способностью препарата оказывать позитивное влияние на экзогенную антиоксидантную систему защиты головного мозга, повышая активность супероксиддисмутазы, глутатионзависимых ферментов, увеличивая концентрацию восстановленной формы глутатиона, нейтрализуя гиперпродукцию свободных радикалов путем прямого взаимодействия с активными формами кислорода, ослабляя, таким образом, проявление оксидативного стресса в ишемизированной ткани мозга. Нейропротективный эффект мексидола, по-видимому, связан с его мембраностабилизирующей активностью. Можно предположить, что вызывая репарацию структурно-функциональных нарушений в мембране и одновременно являясь модулятором ГАМК-бензодиазепинового комплекса, препарат оказывает ГАМК-позитивный эффект, тем самым устраняя дисбаланс между тормозными и возбуждающими аминокислотами, вызванный ишемическим поражением головного мозга.

Таким образом, исследуемые в настоящей работе препараты действуют на различные, но взаимосвязанные звенья патогенеза ишемии головного мозга, обеспечивая нейропротективное действие.

ВЫВОДЫ

1. Окклюзия ветви средней мозговой артерии у крыс приводит к развитию зоны инфаркта, которая затрагивает лобно-теменную область коры головного мозга и составляет около $22,5 \pm 3$ % от общего объема ипсилатерального полушария. Нооглютил (10 мг/кг/день), фенил-*t*-бутилнитрон (100 мг/кг/день) и мексидол (100 мг/кг/день) при введении в первый день внутривенно, а в последующие 2 дня — внутрибрюшинно, эффективно ограничивают зону поражения.

2. Мексидол и, особенно, нооглютил улучшают воспроизведение УРПИ, нарушенное у крыс с окклюзией средней мозговой артерии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 03-04-492231.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Воронина, Т. Л. Гарибова, И. В. Хромова, и др., *Лекарства — человеку, Международный сборник научных трудов IV научно-практической конференции по созданию и апробации новых лекарственных средств*, Том IV, Москва, 135 – 149 (1997).
2. Т. А. Воронина, *Ж. психофармакол. биол. наркол.*, **1**(1), 2 – 12 (2001).
3. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва (2001).
4. И. В. Комиссаров, *Синаптические ионотропные рецепторы и познавательная деятельность*, Медицина, Донецк (2001), сс. 99 – 110.
5. R. Ader, W. Weijnen, and P. Moleman, *Retention of a passive avoidance response as a function of the intensity and duration of electric shock.*, *Psychon. Sci.*, **26**, 125 – 128 (1972).
6. D. E. Anderson, X. J. Yuan, C. M. Tseng, I. J. Rubin, et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, **193**(3), 878 – 885 (1993).
7. K. Baker, C. B. Markus, K. Huffman, et al., *JPET*, **284**(1), 215 – 221 (1998).
8. J. V. Bederson, L. H. Pitts, S. M. Germano, et al., *Stroke*, **17**, 1304 – 1308 (1986).
9. H. Brauner-Osborne, J. Egebjerg, E. Nielsen, et al., *J. Med. Chemistry*, **48**(14), 2609 – 2645, (2000).
10. S. Brint, M. Jacewicz, M. Kiessling, et al., *J Cereb Blood Flow Metab.*, **8**(4), 474 – 485(1988).
11. S. T. Chen, C. Y. Hsu, E. L. Hogan, H. Maricq, and J. D. Balentine, *Stroke*, **17**(4), 738 – 743 (1986).
12. N. C. Danbolt, *Progress in Neurobiology*, **65**(1), 1 – 105 (2001).
13. Y. Gilgun-Sherki, Z. Rosenbaum, E. Melamed, and D. Offen, *Pharmacol Rev.*, **54**(2), 271 – 284 (2002).
14. R. A. Floyd, K. Hensley, M. J. Forster, et al., *Ann N^o Y Acad Sci.*, **959**(3), 321 – 329 (2002).
15. J. Folbergrová, Q. Zhao, K. Katsura, and B. Siesjö, *Proc Nat Acad Sci USA*, **92**(11), 5057 – 5061 (1995).
16. H. Kawai, H. Nakai, M. Suga, et al., *JPET*, **281**(2), 921 – 927 (1997).
17. Y. Kotake, H. Sang, T. Miyajima, and G. L. Wallis, *Biochim Biophys Acta.*, **1448**(1), 77 – 84 (1998).
18. S. Kuroda, K. Katsura, L. Hillered, et al., *Neurobiol Dis.*, **3**(2), 149 – 157 (1996).
19. G. Lavie, A. Teichner, E. Shohami, et al., *Brain Res.*, **910**, 195 – 201(2001).
20. P. Lipton, *Physiol. Rev.*, **79**(4), 1431 – 1568 (1999).
21. Y. Numagami, S. T. Ohnishi, *J. Nutrition*, **131**(3), 1100S – 1105S (2001).
22. R. G. Robinson, *Cambridge University Press*, (1998).
23. J. M. Roda. F. Carceller, E. Diez-Tejedor, and C. Avendano, *Stroke*, **26**(10), 1888 – 1892 (1995).
24. N. J. Solenski, A.-L. Kwan, and H. Yanamoto, *Stroke*, **28**(12), 2545 – 2552 (1997).
25. T. Takasago, E. E. Peters, D. I. Graham, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **37**(3), 412 – 422 (1997).
26. T. A. Voronina, *Sov. Med. Rev. G. Neuropharmacology*, **2**, 51 – 106, (1992).

Поступила 29.09.03

THE EFFECT OF PHENYL-*TERT*-BUTYLNITRONE, MEXIDOL, AND NOOGLUTYL ON THE ISCHEMIC CEREBRAL AFFECTION ZONE AND MEMORY OF RATS UPON MEDIAL CEREBRAL ARTERY OCCLUSION

O. V. Povarova¹, T. L. Garibova², E. I. Kalenikova¹, I. P. Galaeva², V. A. Kraineva², O. S. Medvedev¹, and T. A. Voronina²

¹ Pharmacology Chair, Department of Fundamental Medicine, Moscow State University, Lomonosovskii pr. 31/5, Moscow, 117192 Russia

² Laboratory of Psychopharmacology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

An ischemic cerebral affection zone amounting to $22.51 \pm 3.0\%$ of the ipsilateral hemisphere volume was found on the frontal brain sections in the frontoparietal cortex of rats 72 h after occlusion of the distal branch of the medial cerebral artery. The new nootropic drug nooglutyl [N-(5-hydroxynicotinoyl)-L-glutamic acid] in a dose of 10 mg/kg, as well as mexidol or phenyl-*tert*-butylnitron (PBN) in a dose of 100 mg/kg, introduced into the vein at the moment of occlusion and intraperitoneally for two days after operation, effectively restricted the affected zone: nooglutyl, up to $7.6 \pm 2.28\%$; mexidol, up to $9.55 \pm 1.9\%$; and PBN, up to $12.8 \pm 1.7\%$ of the ipsilateral hemisphere volume. On the third day after operation, animals preliminarily learnt to the passive avoidance conditioned reflex exhibited violated memory retrieval. The retrieval was significantly improved in the test animals treated with mexidol and especially nooglutyl.