

## ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ А-АГОНИСТОВ НА МАЛОИНВАЗИВНОЙ МОДЕЛИ ИШЕМИИ СПИННОГО МОЗГА У КРЫС

Г. З. Суфианова, Л. А. Усов, А. А. Суфианов, А. Г. Шапкин, Л. Ю. Раевская<sup>1</sup>, С. С. Голубев

Изучены возможности нейропротекторной терапии А<sub>1</sub>-агонистами циклогексиладенозином и циклопентиладенозином (ЦГАи ЦПА) на малоинвазивной модели ишемии спинного мозга у крыс, наиболее близко воспроизводящей этот патологический процесс в клинике у человека. Ишемию спинного мозга создавали интравазальной окклюзией брюшной аорты и ее ветвей. ЦГА и ЦПА вводили интрацеребровентрикулярно в дозе 25 мкг/кг за 60 мин до ишемии. Защитное действие изучали путем сравнения неврологических и гистопатологических нарушений при ишемии и на фоне введения этих препаратов. Показан выраженный и статистически значимый нейропротекторный эффект А<sub>1</sub>-агониста ЦПА на избранной малоинвазивной модели ишемии спинного мозга крысы. ЦГА является реальным, но более слабым протектором. Предполагается перспективность использования А-агонистов в клинической практике.

**Ключевые слова:** циклогексиладенозин, циклопентиладенозин, ишемия, спинной мозг, крысы

### ВВЕДЕНИЕ

Основные усилия в фармакологической защите спинного мозга при ишемии сосредоточены в коррекции гемодинамики. Однако эффективность проводимой терапии невысока и до сих пор не существует метода, который вызывал бы восстановление утраченных функций спинного мозга [4, 5, 11]. В этой связи логичен и актуален поиск препаратов, обеспечивающих непосредственную защиту нейронов и проводящих путей спинного мозга. Перспективными препаратами этой группы являются агонисты аденозиновых рецепторов (А-агонисты) [1, 3, 7, 9].

Результаты экспериментальных исследований не всегда получают клиническое подтверждение вследствие того, что многие из применяемых в эксперименте моделей ишемического повреждения мозга лишь весьма отдаленно отражают ишемический инсульт у человека. В этой связи особого внимания заслуживает изучение возможностей нейропротекторной терапии на моделях ишемии спинного мозга, наиболее близко воспроизводящих этот патологический процесс в клинике у человека [12, 13]

Целью работы было изучение защитного действия агонистов аденозиновых рецепторов циклогексиладенозина (ЦГА) и циклопентиладенозина (ЦПА) на малоинвазивной модели ишемии спинного мозга.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 33 беспородных крысах-самках массой 100 – 160 г. Крыс наркотизировали этаминал-натрием в дозе 30 мг/кг. Животные были разделены на три серии. Животным I серии (контроль) ( $n = 10$ ) моделировали ишемию спинного мозга по описанной ниже методике. Во II серии ( $n = 10$ ) изучали воздействие ЦГА на очаг ишемии спинного мозга. ЦГА вводили в дозе 25 мкг/кг за 60 мин до ишемии интрацеребровентрикулярно. Во III серии ( $n = 13$ ) изучении эффект ЦПА при ишемии спинного мозга. Раствор ЦПА вводили в дозе 25 мкг/кг за

60 мин до ишемии интрацеребровентрикулярно. Интрацеребровентрикулярное введение препаратов осуществляли микрошприцем собственной конструкции в правый боковой желудочек головного мозга крысы через правую теменную кость [3].

Транзиторную ишемию поясничного отдела спинного мозга создавали тотальной интравазальной окклюзией брюшной аорты и ее ветвей (рис. 1). С этой целью в обе бедренные артерии по направлению к сердцу вводили окклюдеры. Глубину введения окклюдера определяли расстоянием от мечевидного отростка до основания хвоста. После этого производили пункционное введение в левую общую сонную артерию ниже места ее лигирования 0,3 мл 1% раствора феракрила по направлению к окклюдерам. Регистрировали время введения феракрила и начинали отсчет времени ишемии. Через 45 мин окклюдеры извлекали с последующей перевязкой бедренных артерий. В качестве окклюдера использовали стерильную нить из хромированного кетгута 3.0. Отсутствие нейротоксических свойств феракрила показано ранее [14].

Оценку защитного действия исследуемых препаратов проводили в постишемическом периоде по выраженности неврологических нарушений согласно 4-балльной шкале (табл. 1). Кроме того, в течение всего срока ишемии каждые 5 мин оценивали глубокую, тактильную, температурную и болевую чувствительность по 5-балльной шкале: отсутствие реакции — 0 баллов; слабо выраженная реакция на раздражитель — 1 балл; заметное снижение и/или замедление реакции на раздражитель — 2 балла; незначительное снижение и/или замедление реакции на раздражитель — 3 балла; реакция не изменена — 4 балла.

Через 48 ч спинной мозг извлекали и фиксировали в 96% спирте. Изучали поперечные срезы спинного мозга на уровне поясничного утолщения, окрашенные гематоксилин-эозином. Подсчитывали количество нейронов (нормальных клеток, клеток с хроматолизом, клеток-теней), находящихся на разных стадиях гистопатологических изменений.

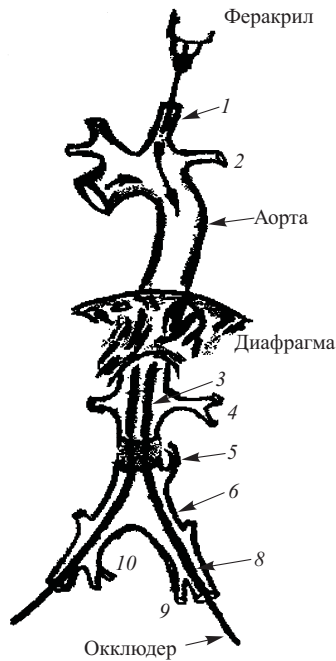
В экспериментах использовали 1% раствор феракрила производства ТОО ПКФ "Пуск", Иркутск.

Результаты обработаны статистически с использованием непараметрического критерия U [2].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании ишемии по предложенной методике у животных I серии в течение всего срока ишемии отмечалось постепенное симметричное угасание различных видов чувствительности, побледнение, по-

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. Л. А. Усов) Иркутского государственного медицинского университета и отделение нейрохирургии детского возраста (зав. — А. А. Суфианов) Иркутской областной детской больницы.



**Рис. 1.** Схема введения окклюдера при моделировании интравазальной окклюзии брюшной аорты и ее ветвей у крыс.

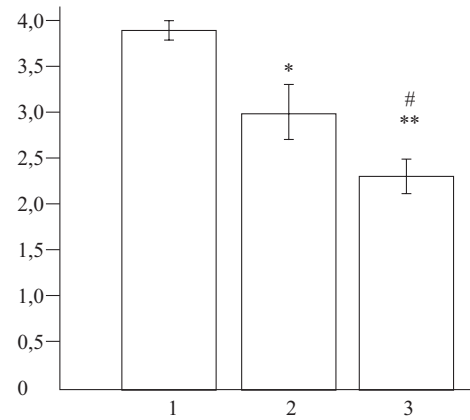
1 — левая общая сонная артерия, 2 — подключичная артерия, 3 — артерия Адамкевича, 4 — почечная артерия, 5 — 2-я поясничная артерия, 6 — общая подвздошная артерия, 7 — подвздошно-поясничная артерия, 8 — наружная подвздошная артерия, 9 — внутренняя подвздошная артерия, 10 — латеральная крестцовая артерия.

холодание и снижение тонуса мышц задних конечностей. Отмечалось угасание чувствительности на обеих конечностях снизу вверх. Клиническая картина в постишемическом периоде характеризовалась симметричной параплегией по периферическому типу, выявляемой сразу после операции, исчезновением всех видов чувствительности с задних конечностей и поясничной области, тазовыми расстройствами (оценка неврологических расстройств в среднем составила  $3,9 \pm 0,1$  балла) (рис. 2). На 2-е сутки определялись трофические изменения мышц поясничной области и задних конечностей.

У животных первой группы среднее время появления снижения реакции для глубокой, тактильной, температурной и болевой чувствительности соответственно составляло  $18,5 \pm 1,3$ ,  $15 \pm 1,2$  и  $17,5 \pm 1,7$  мин (табл. 2). Отмечалось практически полное угасание всех видов чувствительности к 45-й минуте ишемии. Статистическая разница между результатами, полу-

**Таблица 1. Шкала неврологических расстройств**

Балл	Клинические проявления
1	Норма
2	Умеренный нижний парапарез, незначительная гипестезия, непроизвольное мочеиспускание
3	Выраженный нижний парапарез и гипестезия, задержка мочеиспускания
4	Параплегия, анестезия, анурия



**Рис. 2.** Выраженность неврологических расстройств у крыс при ишемии спинного мозга: эффекты ЦГА и ЦПА.

По оси ординат — выраженность неврологических расстройств в баллах; по оси абсцисс: 1 — животные I группы (ишемия); 2 — животные II группы (ишемия + ЦГА); 3 — животные III группы (ишемия + ЦПА). \* —  $p < 0,05$  в сравнении с ишемией; \*\* —  $p < 0,001$  в сравнении с ишемией; # —  $p > 0,1$  в сравнении с животными II группы.

ченными для тактильной, глубокой, температурной и болевой чувствительности оказалась недостоверной.

У всех животных отмечались ишемические изменения всех органов брюшной полости, забрюшинного пространства и поясничной области, как при макроскопическом, так и при микроскопическом исследовании.

При гистологическом изучении срезов поясничного утолщения спинного мозга у крыс первой группы морфологическая картина сопровождалась значительными ишемическими повреждениями. Гистопатологические изменения характеризовались деструкцией волокнистых структур, гомогенизацией и хроматолизом цитоплазмы нейронов, пикнозом ядер, растворением глыбок базофильного вещества Ниссля и превращением нейронов в клетки-тени. Отмечалась распространенная нейронофагия, отек белого вещества. Передние рога спинного мозга были поражены в большей степени (рис. 3, б). Распределение нейронов по степени повреждения составило соответственно: нормальные нейроны — 29%; хроматолиз нейронов — 17%; клетки-тени — 54% (рис. 4).

Введение А-агонистов вызывало значительный защитный эффект по всем исследуемым критериям. Так,

**Таблица 2. Среднее время появления нарушений различных видов чувствительности (мин): эффекты ЦГА и ЦПА**

Виды чувствительности	Ишемия	Ишемия + ЦГА	Ишемия + ЦПА
Температурная и болевая чувствительность	$17,5 \pm 1,7$	$23 \pm 1,3^{*#}$	$29,2 \pm 1,8^{**}$
Тактильная чувствительность	$15,0 \pm 1,2$	$19,5 \pm 1,2^{*#}$	$25,4 \pm 1,8^{**}$
Глубокая чувствительность	$18,5 \pm 1,3$	$22 \pm 1,5^{\#}$	$30,8 \pm 2,2^{**}$

**Примечание.** Различия достоверны в сравнении: \* — с ишемией;  $p < 0,05$ ; \*\* — с ишемией;  $p < 0,001$ ; # — с животными на фоне введения ЦПА;  $p < 0,05$ .

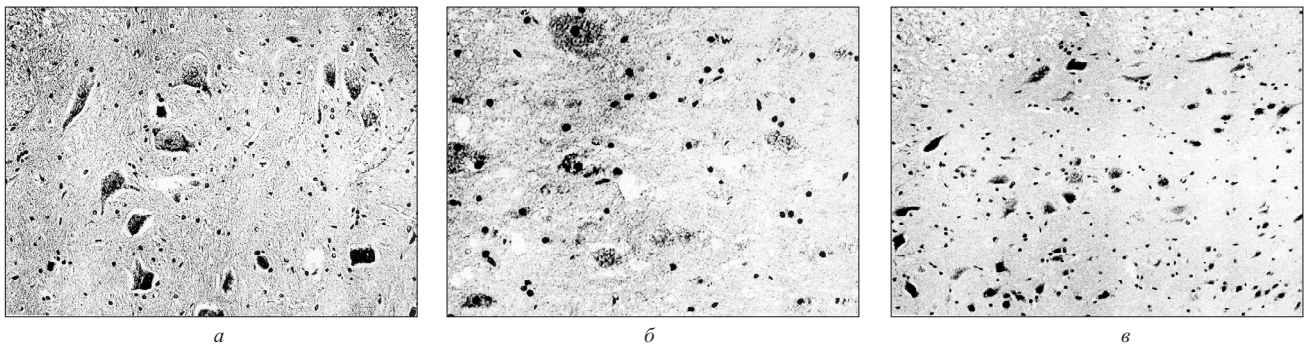


Рис. 3. Гистологическая картина поперечных срезов спинного мозга на уровне поясничного утолщения : а — в норме ; б — при ишемии ; в — на фоне введения ЦПА.

Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 200.

на фоне введения ЦГА у животных II серии неврологический дефицит в основном характеризовался гипестезией и парализмом в задних конечностях. Уровень неврологических расстройств составил  $3 \pm 0,3$  балла. Этот эффект значимо отличался от показателей у животных контрольной I группы с ишемией ( $p < 0,05$ ). У животных III группы защитный эффект проявлялся наиболее ярко. Уровень неврологических расстройств на фоне введения ЦПА составил  $2,3 \pm 0,2$  балла. Этот эффект был наиболее высоко статистически достоверен относительно животных I группы ( $p < 0,001$ ). Следует отметить, что уровень неврологических расстройств в постиншемическом периоде при предварительном введении ЦПА уменьшался более выражение, чем у животных II серии с ЦГА, однако эта разница не достигала статистической значимости ( $p > 0,1$ ), рис. 2. Ишемические изменения внутренних органов у животных II и III серий не отличались от подобных изменений у контрольных животных.

На фоне введения А-агонистов заметно и статистически достоверно менялось среднее время появления

снижения реакции для тактильной, глубокой, температурной и болевой чувствительности. Общим для этих препаратов являлось увеличение этого времени, свидетельствующее о защитном эффекте (рис. 5). На фоне введения ЦПА это время для температурной и болевой, глубокой и тактильной чувствительности соответственно составило  $23 \pm 1,3$ ;  $22 \pm 1,5$ ;  $19,5 \pm 1,2$  мин. Этот эффект статистически значим (например, для температурной и болевой, а также для тактильной чувствительности  $p < 0,05$ , относительно животных I се-

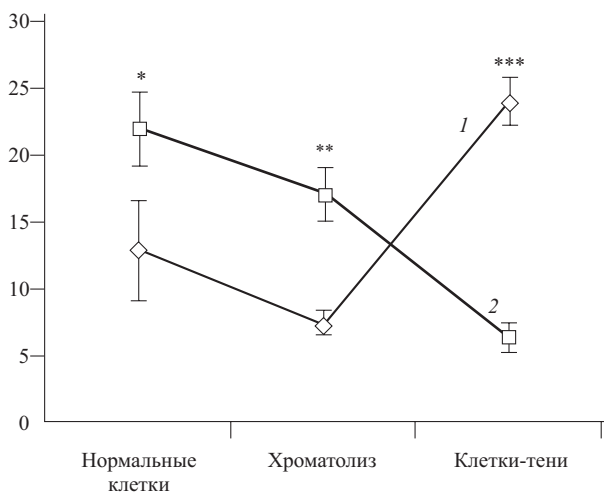


Рис. 4. Соотношение нейронов поясничного утолщения спинного мозга при ишемии и на фоне введения ЦПА.

\* —  $p < 0,1$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ . По оси ординат — количество клеток, по оси абсцисс — степень деструкции клеток. 1 — ишемия, 2 — ЦПА.

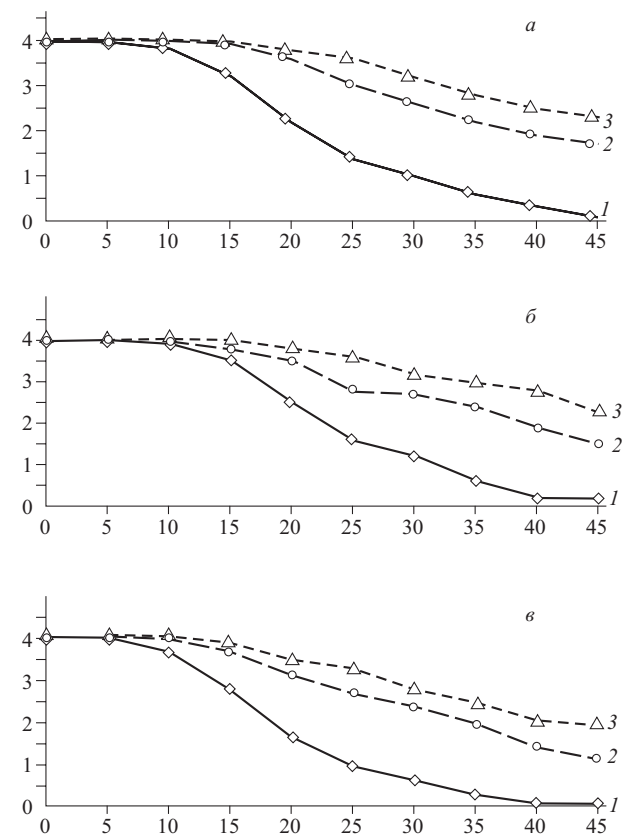


Рис. 5. Динамика угасания различных видов чувствительностей: эффекты ЦГА и ЦПА: а — болевая и температурная; б — глубокая; в — тактильная.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — уровень чувствительности, баллы. 1 — ишемия, 2 — ЦГА, 3 — ЦПА.

рии с ишемией). Наибольшее удлинение времени появления снижения реакции отмечалось на фоне введения ЦПА. Для температурной и болевой, глубокой и тактильной чувствительности это время соответственно составило  $29,23 \pm 1,8$ ;  $30,8 \pm 2,2$ ;  $25,4 \pm 1,8$  мин. Это защитное действие являлось наиболее высоко статистически достоверно ( $p > 0,001$  относительно животных I серии с ишемией), табл. 2.

Нейропротекторный эффект А-агонистов выявлен при морфологическом изучении срезов поясничного утолщения спинного мозга. Особенно наглядно это проявилось на фоне введения ЦПА. Гистопатологическая картина характеризовалась ишемическими изменениями единичных нейронов в основном в передних рогах спинного мозга (рис. 3, в). Согласно количественным критериям этот эффект резко выражен и статистически значим. Распределение нейронов по степени повреждения составило: нормальные нейроны — 48%; хромотолиз нейронов — 37%; клетки-тени — 15% ( $P < 0,01$  для нейронов с хромотолизом и клеток-теней относительно животных с ишемией) (рис. 4).

Результаты показывают, что при моделировании ишемии по предложенной методике развиваются выраженные ишемические изменения поясничного утолщения спинного мозга, что согласуется с целью работы. Селективная интраваскулярная окклюзия, используемая в данной модели, определяет малоинвазивность и адекватность методики применительно к клинической патологической ситуации. Это определило использование модели в данном исследовании по нейропротекторной активности А-агонистов.

В литературе описано участие аденозина и других А-агонистов в защите головного мозга от ишемии [1, 3, 7, 9]. Кроме того, в последнее время углубились представления о наличии и локализации аденозиновых рецепторов в спинном мозге [6, 8, 10]. Это определило возможность использования А-агонистов с целью защиты спинного мозга от ишемии.

Полученные результаты свидетельствуют, что оба исследованных А-агониста оказывают нейропротекторный эффект на модели ишемии спинного мозга. Это защитное действие статистически достоверно по всем исследуемым критериям. Наибольшим защитным эффектом обладает ЦПА. Очевидно, это объясняется тем, что ЦПА как минимум в 2 раза менее активен

как селективный А<sub>1</sub>-агонист [15]. Таким образом, выраженность миелопротекторного эффекта связана со сродством к А<sub>1</sub>-рецепторам. Эти данные согласуются с литературой и нашими исследованиями [3] по церебропротекторному эффекту А<sub>1</sub>-агонистов.

## ВЫВОДЫ

1. Предложенный способ ишемии спинного мозга малоинвазивен, не требует специального оборудования и инструментария для реализации, позволяет контролировать сроки ишемии и уровень окклюзии нисходящей части аорты.

2. Агонисты аденозиновых рецепторов циклогексиладенозин (ЦГА) и циклопентиладенозин (ЦПА) оказывают нейропротекторный эффект на модели ишемии спинного мозга. Селективный А<sub>1</sub>-агонист ЦПА обладает более выраженным защитным свойством.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Елисеев, Г. М. Полтавченко, *Роль аденозина в регуляции физиологических функций организма*, Наука, Санкт-Петербург (1991).
2. Л. Закс, *Статистическое оценивание*, Статистика, Москва (1976).
3. В. И. Кулинский, Г. З. Суфианова, Л. А. Усов, А. А. Суфианов, *Бюл. exper. биол.*, **117**(6), 622 – 624 (1994).
4. А. В. Лившиц, *Хирургия спинного мозга*, Медицина, Москва (1990).
5. О. А. Перльмуттер, *Травма позвоночника и спинного мозга*, Н. Новгород (2000).
6. J. I. Choca, H. K. Proudfit, and R. D. Green, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **242**, 905 – 910 (1987).
7. В. В. Fredholm, *News Physiol. Sci. (NIPS)*, **10**, 122 – 128 (1995).
8. В. В. Fredholm, M. P. Abbracchio, G. Burnstock, et al., *Pharmacol. Rev.*, **46**, 143 – 156 (1994).
9. J. Fricker, *Molecular Medicine Today*, **6**, 48 (2000).
10. J. D. Geiger, F. S. LaBella, and J. I. Nagy, *J. Neurosci.*, **4**, 2303 – 2310 (1984).
11. F. Gharagozloo, J. Larson, M. J. Dausmann, et al., *Chest*, **109**, 799 – 809 (1996).
12. J. Gonzalez-Fajardo, A. Beatriz, J. L. Perez-Burkhardt, et al., *J. Vasc. Surg.*, **23**, 446 – 452 (1996).
13. L. Lang-Lazdinski, K. Matsushita, L. Hirt, et al., *Stroke*, **31**, 208 – 213 (2000).
14. А. А. Суфианов, А. Г. Шапкин, Г. З. Суфианова, et al., *Europ. Neuropsychopharmacology*, **10**, Suppl.2, S93, 622 (2000).
15. M. Williams, A. Braunwalder, and T. J. Erickson, *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.*, **332**, 179 – 183 (1986).

Поступила 24. 10.01

## THE PROTECTIVE ACTION OF A-AGONISTS STUDIED ON A MINIMUM INVASIVE MODEL OF SPINAL CORD ISCHEMIA IN RATS

G. Z. Sufianova, L. A. Usov, A. A. Sufianov, A. G. Shapkin, L. Yu. Raevskaya and S. S. Golubev

Department of Pharmacology, Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia;

The neuroprotective properties of N6-cyclohexyladenosine (CHA) and N6-cyclopentyladenosine (CPA), adenosine receptor agonists (A-agonists), were studied on a model of spinal cord ischemia (SCI) in rats (most closely reproducing the analogous clinical pathological process in humans). The SCI model was induced by intravasal occlusion of the abdominal aorta and its branches. CHA and CPA were introduced by intracerebroventricular injections in a dose of 25 µg/kg, 60 min before SCI induction. The protective effect was judged by comparing the patterns of neurological and histopathological disturbances in the untreated control (ischemia) and on the CHA or CPA background. The A-agonist CPA produced a pronounced, statistically reliable neuroprotector effect on the minimum invasive SCI model studied. CHA is also a statistically reliable but less effective neuroprotector. The A-agonists may have good prospects in clinics.