

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕЙРОНОВ СЕНСОМОТОРНОЙ ЗОНЫ ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, В. В. Дунаев, Н. В. Бухтиярова¹

Введение тиотриазолина, эмоксипина и магнелонга животным с острым нарушением мозгового кровообращения оказывало выраженный нейропротекторный эффект в острый и отдаленный сроки ишемии, что характеризовалось приближением показателей плотности нейронов коры мозга, их удельного количества, а также показателей апоптотических и деструктивно измененных нейронов к уровню интактных крыс. Пирацетам демонстрировал церебропротекторные свойства только в отдаленный период ишемического поражения головного мозга. Наиболее выраженным нейропротекторным эффектом среди изученных препаратов обладал магнелонг, который сохраняет плотность нейронов коры большого мозга на уровне интактных животных и предупреждает рост количества апоптотических и деструктивно измененных нейронов.

Ключевые слова: ишемический инсульт, глутаматная эксайтотоксичность, нейропротекция, фронтальная кора

ВВЕДЕНИЕ

Поиск способов фармакологической коррекции изменений, возникающих при острых нарушениях мозгового кровообращения, а также препаратов, снижающих степень нейродегенерации при ишемии мозга, является актуальной задачей современной фармакологии. На сегодняшний день экспериментальным путем выявлена эффективность ионов магния в виде $MgSO_4$ и $MgCl_2$, которые блокируют NMDA-ассоциированные каналы потенциал-зависимым способом, обладают значительным нейропротекторным свойством при отсутствии побочных эффектов [7]. Определенный интерес в качестве первичного нейропротектора вызывает глицин. Он обеспечивает нормальное функционирование NMDA-рецепторов, благодаря влиянию на глициновые участки связывания, обладает метаботропным эффектом. Естественным фактором защиты нейрона в условиях ишемии является ГАМК, которая модулирует активность главного возбуждающего нейромедиатора — глутамата, создает стойкое равновесие между возбуждающими и тормозными системами [1, 2, 10, 11]. Исходя из этого, нами была создана композиционная лекарственная форма, которая содержит магния хлорид (0,5 – 1 г), глицин (2 – 2,5 г), ГАМК (3 – 3,5 г), воду дистиллированную (до 100 мл) под рабочим названием “магнелонг” [3]. Целью данного исследования является изучение нейропротекторного эффекта магнелонга в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по

влиянию на развитие неврологического дефицита, изменению морфологических показателей повреждения нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на белых крысах линии Вистар обоего пола, массой 150 – 200 г. Нарушение мозгового кровообращения вызывали необратимой двухсторонней перевязкой общих сонных артерий. Изучаемые препараты вводили внутривентриально сразу после выхода животных из наркоза, один раз в сутки в течение 4 дней. Каждый день определяли выраженность неврологического дефицита по шкале McGrow [12]. На четвертые сутки животных выводили из эксперимента под этиминал-натриевым наркозом путем декапитации. С целью изучения результатов фармакокоррекции у животных извлекали мозг, фиксировали его в 10 % жидкости Буэна (24 ч) и по стандартной схеме заливали в парафиновые блоки, из которых готовили серийные фронтальные 5-микронные срезы в области постцентральной извилины (соматосенсорная кора). Для изучения морфофункционального состояния нейронов IV – V слоев коры срезы депарафинировали по стандартной методике и окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для специфического выявления РНК [8]. Изображение коры мозга получали на микроскопе Axioskop (“Zeiss”, Германия) и с помощью 8-битной CCD-камеры COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (“Kontron Elektronik”, Германия). Морфометрический анализ клеток мозга осуществляли в автоматическом режиме

¹ Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, 69035, пр. Маяковского, 26.

Таблица 1. Влияние тиотриазолина, пираретама, эмоксипина и магнелонга на выживаемость и развитие неврологического дефицита животных в различные сроки после ОНМК

Группа животных	Средний балл по шкале С. Р. McGrow		Кол-во выживших животных, %
	4-е сутки	18-е сутки	
Ишемия (контроль)	17,66 ± 2,02	4,3 ± 0,33	30
Ишемия + тиотриазолин	7,16 ± 0,59*	2,2 ± 0,47*	70*
Ишемия + эмоксипин	6,21 ± 0,47*	2,7 ± 0,11*	70*
Ишемия + пираретам	8,8 ± 0,8*	3,6 ± 0,42	50
Ишемия + магнелонг	6,6 ± 0,6*	1,7 ± 0,28*	90*

Примечание. Здесь и в табл. 2 – 5 отличия достоверны по отношению к группе контрольных крыс при * — $p < 0,05$.

с помощью макро-программы, разработанной в специализированной среде программирования VIDAS-2.5 (“Kontron Elektronik”, Германия) [4].

Определяли следующие показатели: плотность нейронов, глиальных клеток, апоптотических и деструктивно измененных нейронов (количество клеток на 1 мм² площади среза коры мозга); площадь тел нейронов, апоптотических и деструктивно измененных нейронов (в мкм²); концентрацию РНК в нейронах, апоптотических и деструктивно измененных нейронах (единицы оптической плотности, E_{оп}), которые рассчитывали как логарифм отношения оптической плотности тела клетки к оптической плотности межклеточного вещества. Количество c-Fos-положительных нейронов определяли иммуногистохимическим методом.

Различия между группами оценивали статистически с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента с помощью программы Biostat и MS Excell. Достоверность отличий относительных величин оценивали с применением критерия χ^2 . Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение крысам с ОНМК тиотриазолина, эмоксипина, пираретама и магнелонга оказывало разный по выраженности нейропротекторный эффект. Указанные

препараты ослабляли развитие неврологического дефицита, ускоряли восстановление неврологического статуса, улучшали процессы обучения и памяти, снижали гибель животных с двусторонней перевязкой общих сонных артерий (ишемический инсульт), что свидетельствует об их церебропротекторном эффекте. На этом фоне выделялся магнелонг который снижал возникновение неврологической симптоматики и летальности почти в 2,6 раза, превосходя по этим показателям тиотриазолин, эмоксипин, пираретам (табл. 1).

В наших предыдущих исследованиях [4] пираретам в дозе 250 мг/кг оказывал негативное влияние и активизировал нейродегенеративные процессы. Поэтому в данном исследовании его использовали в дозе 500 мг/кг. Экспериментальная терапия животных с ОНМК пираретамом приводила к увеличению плотности нейронов в коре на 4-е сутки ишемии в 1,5 раза. В отдаленные сроки ишемии, по сравнению с группой контрольных (с ОНМК) крыс, пираретам способствовал уменьшению плотности нейронов и снижению содержания РНК (табл. 2). Однако количество апоптотических и деструктивно измененных нейронов при введении пираретама животным с ОНМК не отличалось от показателя в группе контрольных животных в острый период ишемии, но в отдаленные сроки он достоверно снижал процент апоптотических нейронов, способствовал сохранению высокой функциональной активности нейроглии. Таким образом, пираретам в острый период мозгового инсульта не обладает церебропротекторным действием, так как, влияя исключительно на анаэробное окисление, способен усиливать явления лактат-ацидоза и тем самым ухудшать общую картину ишемии мозга, что в целом подтверждается результатами биохимических экспериментальных и клинических исследований [4, 5]. В восстановительный период данный препарат значительно повышал плотность нейронов и глиальных клеток, что приводило к повышению общей плотности клеток в 1,5 раза относительно контрольных значений, и снижал процент апоптотических нейронов в 2,2 раза.

Тиотриазолин и эмоксипин оказывали нейропротекторное действие у крыс с ОНМК. Тиотриазолин в условиях ОНМК вызывает значительный глиоцитоз как в острый период, так и в отдаленные сроки, который выражался увеличением общей площади глиаль-

Таблица 2. Характеристика нейронов IV – V слоев коры большого мозга крысы с экспериментальной ишемией

Группа животных	Плотность нейронов, клеток/мм ²		Площадь тел нейронов, мкм ²		Содержание РНК в нейронах, E _{оп}	
	4-е сутки	18-е сутки	4-е сутки	18-е сутки	4-е сутки	18-е сутки
Интактные	1281 ± 34	1292 ± 31	75,21 ± 1,12	74,87 ± 1,32	9,69 ± 0,15	9,72 ± 0,14
Ишемия (контроль)	1065 ± 27	1082 ± 19	64,19 ± 0,9	62,12 ± 1,08	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,6
Ишемия + тиотриазолин	1081 ± 29	1117 ± 32*	62,97 ± 1,14	65,12 ± 0,94*	6,26 ± 0,16*	7,19 ± 0,28
Ишемия + эмоксипин	1182 ± 24*	1235 ± 18*	67,78 ± 1,13*	68,67 ± 1,08*	6,76 ± 0,11*	7,23 ± 0,15
Ишемия + пираретам	1069 ± 38	1163 ± 26*	63,46 ± 0,8	68,71 ± 0,93*	5,73 ± 0,18*	8,03 ± 0,23
Ишемия + магнелонг	1278 ± 17*	1307 ± 22*	69,52 ± 0,65*	70,82 ± 0,72*	8,17 ± 0,12*	9,67 ± 0,17*

Таблица 3. Характеристика глиальных клеток IV – V слоев коры большого мозга крысы с экспериментальной ишемией

Группа животных	Плотность глиальных клеток, клеток/мм ²		Площадь тел глиальных клеток, мкм ²		Содержание РНК в глиальных клетках, Еоп	
	4-е сутки	18-е сутки	4-е сутки	18-е сутки	4-е сутки	18-е сутки
Интактные	418 ± 21	421 ± 14	20,5 ± 0,19	20,7 ± 0,24	3,34 ± 0,07	3,31 ± 0,05
Ишемия (контроль)	396 ± 11	410 ± 11	21,2 ± 0,11	21,8 ± 0,17	1,05 ± 0,02	1,03 ± 0,02
Ишемия + тиотриазолин	476 ± 14*	493 ± 12*	22,5 ± 0,21*	23,9 ± 0,21*	2,13 ± 0,02*	2,16 ± 0,02*
Ишемия + эмоксипин	469 ± 17*	485 ± 15*	22,8 ± 0,14*	23,7 ± 0,17*	2,11 ± 0,03*	2,14 ± 0,02*
Ишемия + пирацетам	497 ± 19*	507 ± 14*	21,7 ± 0,28	24,9 ± 0,31*	1,25 ± 0,02*	1,29 ± 0,03*
Ишемия + магнелонг	465 ± 12*	478 ± 11*	23,4 ± 0,15*	25,0 ± 0,14*	3,17 ± 0,03*	3,21 ± 0,01*

Таблица 4. Плотность апоптотических и деструктивно измененных клеток IV – V слоев коры большого мозга крысы с экспериментальной ишемией

Группа животных	Плотность клеток на 1 мм ²		Доля апоптотических клеток, %	
	4-е сутки	18-е сутки	4-е сутки	18-е сутки
Интактные	107 ± 9	110 ± 7	4,5 ± 0,53	4,3 ± 0,61
Ишемия (контроль)	294 ± 18	287 ± 18	17,45 ± 0,8	14,36 ± 0,74
Ишемия + тиотриазолин	169 ± 16*	132 ± 10*	9,7 ± 0,41*	7,5 ± 0,49*
Ишемия + эмоксипин	174 ± 11*	128 ± 13*	7,8 ± 0,51*	6,7 ± 0,35*
Ишемия + пирацетам	438 ± 29*	153 ± 18*	16,3 ± 1,7	6,4 ± 0,52*
Ишемия + магнелонг	119 ± 5*	107 ± 9*	5,8 ± 0,6*	4,7 ± 0,65*

ных клеток и их плотности. При введении тиотриазолина отмечено повышение содержания РНК в клетках нейроглии, что свидетельствует о повышении функциональной активности клеток, активации генов и синтезе белка. Глиоцитоз является компенсаторным механизмом, который включается при повреждении нервной ткани [4].

Введение эмоксипина оказывало более выраженный церебропротекторный эффект. У экспериментальной группы крыс, которые получали эмоксипин, при анализе морфологических показателей наблюдалось увеличение плотности и площади тел нервных клеток. Возрастание содержания РНК в нейронах при введении эмоксипина свидетельствует о стимуляции генной активности и об активации процессов трансляции в нейронах. Такое влияние эмоксипина связано с его выраженным активирующим влиянием на антиоксидантную систему ферментов [8, 9].

Наибольшим положительным противоишемическим эффектом обладал магнелонг. Характер его действия на нейроглию при ОНМК проявлялся увеличением количества глиальных клеток и нейронов в коре мозга и повышением их морфофункциональной активности (повышение содержания РНК) табл. 3, 4. Полученные данные согласуются с нашими предыдущими исследованиями, в которых показана способность магнелонга снижать неврологическую симптоматику и

нормализовать биохимические показатели оксидативного стресса [5].

В условиях острой ишемии головного мозга наблюдается снижение белка c-Fos к 4-м суткам (снижение c-Fos-позитивных клеток в 3,6 раз) (табл. 5). Начиная с 7-х суток экспериментальной ишемии, наблюдается постепенное восстановление количества c-Fos в нейронах 4 – 5 слоя сенсомоторной зоны коры с максимальным проявлением активности на 18-е сутки. Однако и в эти сроки содержание c-Fos остается низким. Из-

Таблица 5. Содержание c-Fos-позитивных клеток в головном мозге крыс в разные сроки ишемии

Группа животных	Сроки ишемии	Содержание c-Fos позитивных клеток
Интактная	–	15,4 ± 1,07
Ишемия (контроль)	4 сутки	4,0 ± 0,7
	18 сутки	19,0 ± 0,54
Ишемия + тиотриазолин	4 сутки	7,6 ± 0,5*
	18 сутки	23,8 ± 0,86*
Ишемия + пирацетам	4 сутки	5,2 ± 0,58
	18 сутки	19,2 ± 0,66
Ишемия + эмоксипин	4 сутки	8,2 ± 0,66*
	18 сутки	26,0 ± 0,7*
Ишемия + магнелонг	4 сутки	9,4 ± 0,66*
	18 сутки	27,3 ± 0,7*

менение содержания с-Fos в нейронах в разные сроки ишемии, с нашей точки зрения, связано с преобладанием типа гибели клеток. Так, увеличение содержания с-Fos происходило на фоне преобладания гибели клеток по типу апоптоза, а снижение — к усилению гибели по типу некроза. В восстановительный период происходит адаптация клетки и переключение гибели с пути некроза на апоптоз и снижение последнего. Введение антиоксидантов в условиях ОНМК (пирацетам, эмоксипин, тиотриазолин, магнелонг) увеличивает содержание белка с-Fos и, следовательно, уменьшает интенсивность некроза нейронов и усиливает апоптоз. Уменьшается не только процент гибели клеток, но и меняется морфологический тип гибели нейронов, увеличивается апоптотический тип гибели. Все это происходит на фоне снижения угнетения экспрессии с-Fos и содержания белка с-Fos.

ВЫВОДЫ

1. Двусторонняя перевязка общих сонных артерий вызывает тяжелый неврологический дефицит, изменения морфологических показателей повреждения нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры.

2. Введение тиотриазолина, эмоксипина и магнелонга животным с ОНМК оказывает выраженный нейропротекторный эффект в острый и отдаленный сроки ишемии, что характеризуется приближением показателей плотности нейронов коры мозга, их удельного количества, а также показателей апоптотических и деструктивно измененных нейронов к уровню интактных крыс.

3. Пирацетам (500 мг/кг) обладает церебропротекторными свойствами только в отдаленный период ишемического поражения головного мозга.

4. Наиболее выраженным нейропротекторным свойством среди изученных препаратов обладает магнелонг, который сохраняет плотность нейронов коры большого мозга на уровне интактных животных и предупреждает рост количества апоптотических и деструктивно измененных нейронов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Громов, *Механізм дії ліків*, 1, 22 – 25 (2001).
2. О. В. Громова, А. А. Никонов, *Ж. неврол. и психиатр.*, 102(12), 62 – 66 (2002).
3. Ціхотська О. О., Головки В. О., Беленічев І. Ф., 14746 А61К, *Бюл.*, № 5 (2006).
4. И. Ф. Беленичев, И. В. Сидорова, В. В. Дунаев и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, 69(5), 11 – 15 (2006).
5. І. Ф. Беленічев, С. В. Горбачова и др., *Мед. хімія*, 8(3), 107 – 110 (2006).
6. А. А. Болдырев, М. Л. Куклей, *Нейрохирургия*, 13, 271 – 278 (1996).
7. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва (2001).
8. Э. Пирс, *Гистохимия*, Москва (1962).
9. О. В. Поварова, Т. Л. Гаритова, Е. И. Каленикова, *Экспер. и клин. фармакол.*, 67(1), 3 – 6 (2004).
10. К. С. Раевский, В. П. Георгиев, *Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрхимические аспекты*, Медицина, Москва (1986).
11. К. С. Раевский, Г. А. Романова, В. С. Кудрин и др., *Бюл. экпер. биол.*, 4(123), 370 – 373 (1997).
12. С. Р. McGrow, *Arch. Neurol.*, 34(6), 334 – 336 (1977).

Поступила 18.05.07

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF NEURONAL DAMAGE IN SENSOMOTOR ZONE OF FRONTAL CORTEX UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL CEREBRAL BLOOD FLOW PATHOLOGY

S. V. Gorbacheva, I. F. Belenichev, V. V. Dunaev, and N. V. Bukhtiyarova

Zaporozhye State Medical University, pr. Mayakovskogo 26, 69035 Zaporozhye, Ukraine

The administration of thiotriazoline, emoxypine and magnelong (a combined glycine – magnesium preparation) to animals with acute cerebral circulatory insufficiency showed significant neuroprotective effect in both acute and late ischemic periods, as indicated by the indices of cell density and number and the characteristics of apoptic and destructed neurons approaching those in the group of intact rats. Pyracetam showed cerebroprotective effect only in late ischemic period. Magnelong exhibited the most significant neuroprotective effect, maintaining cell density on the intact control level and reducing the number of apoptic and destructed neurons.