

Нейропротекция при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга

Романова Г.А.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 127315, Москва, Балтийская, 8

Исследовано нейропротективное и антиамнестическое действие ГК-2Н, димерного дипептидного миметика человеческого фактора роста нервов в сравнении с пептидными лекарственными средствами ноопептом и семаксом, при двусторонней фокальной фотоиндуцированной ишемии префронтальной коры головного мозга крыс. Установлено, что внутрибрюшинное введение ГК-2Н в дозе 0,1 мг/кг через 1 или 4 ч и далее во 2-е, 4-е и 8-е сутки после операции приводит на 9-е сутки к уменьшению объема коркового инфаркта на 47% или 65%, а также сохраняет выработанный до моделирования ишемического инсульта условный рефлекс пассивного избегания на 42% или 60% соответственно. Делается вывод о перспективности развития ГК-2Н в качестве противоишемического средства.

Ключевые слова: миметик человеческого фактора роста нервов — ГК-2Н, фотоиндуцированный тромбоз, нейропротекция, антиамнестическое действие, ноопепт, семакс

Введение

Эпидемиологические данные свидетельствуют, что инсульт является ведущей причиной смертности в развитых странах [1]. В фармакотерапии инсульта нейропротекция рассматривается как важнейший этап лечебных мероприятий [3]. Поэтому поиск лекарственных средств, снижающих степень нейродегенерации и улучшающих мнестические функции при ишемии мозга, является актуальной патогенетической проблемой.

Нейропротективным действием обладают многие соединения, имеющие различный механизм действия. Исходя из патогенетических механизмов инсульта и известных данных о процессах сохранения и восстановления жизнеспособности нервной ткани, особое внимание уделяется нейротрофинам и пептидам [6, 7, 9].

Димерный дипептид ГК-2Н, создан в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова как миметик бета-изгиба 4-й петли человеческого NGF. Он отличается от ранее изученного крысиного аналога ГК-2 [Гудашева, ДАН, 2010] заменой остатка глутаминовой кислоты на глицин.

Для ГК-2 было показано, что он полностью восстанавливает нарушенное фототромбозом УРПИ при введении через час после операции и на 60% уменьшает объем зоны инфаркта у крыс. Синтез и изучение свойств ГК-2Н обусловлены необходимостью получения фармакологического препарата для последующего использования в клинике.

Целью данной работы было изучение нейропротективных и антиамнестических свойств ГК-2Н *in vivo* на экспериментальной модели, воспроизводящей клиническую картину ишемического инфаркта мозга — фотоиндуцированном тромбозе кровеносных сосудов коры головного мозга [4, 10].

Данная модель ранее валидизирована с использованием препаратов, обладающих нейропротективным и антиамнестическим действием, применяемых для фармакологической коррекции патологии мозга [4].

Материалы и методы

Вещества

Пептид гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина), ГК-2Н, синтезирован в отделе химии НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН.

Хлоральгидрат и фотосенсибилизирующий краситель бенгальский розовый были получены из Sigma Chem.Co.

Животные

Опыты выполнены на самцах беспородных крыс массой 180–200 г, которых содержали в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима. При работе с крысами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Дизайн исследования

Все экспериментальные животные были разделены на 4 группы:

- 1) обученные + ложнооперированные;
- 2) обученные + фототромбоз префронтальной коры;
- 3) обученные + фототромбоз коры + ГК-2Н, 1 ч после операции;
- 4) обученные + фототромбоз коры + ГК-2Н, 4 ч после операции.

Вещество ГК-2Н вводили внутрибрюшинно в дозе 0,1 мг/кг через 1 ч и другой группе через 4 ч после операции, а затем через 24 ч после 1-го введения, на 4-е сутки и на 8-е сутки после первого введения.

Эксперимент включал в себя следующие этапы: операцию фототромбоза, исследование двигательной активности до и на 9-е сутки после фототромбоза; выработку УРПИ до и проверку сохранения УРПИ на 9-е сутки после фототромбоза; забой животных сразу после проверки сохранения УРПИ, извлечение и фиксацию мозгов; морфологическое исследование и измерение объема очага ишемии.

Операция (фототромбоз)

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс (поля Fg1 и Fg2 согласно атласу Paxinos and Watson, 1986) создавали методом фотоиндуцируемого тромбоза [10]. Животных наркотизировали хлоральгидратом (300 мг/кг, в/б). Фотосенсибилизирующий краситель бенгальский розовый вводили в яремную вену в виде 3% раствора в воде, 40 мг/кг. Голову животных фиксировали в стереотаксисе и после продольного разреза кожи удаляли надкостницу.

Световод с диаметром светового пучка на выходе 3 мм устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа по координатам: 2,0 мм роstralнее брегмы и 2,0 мм латеральнее саггитального шва. Облучение холодным светом (источник — ксеноновая лампа 25 В, 250 Вт) проводили в течение 15 мин с каждой стороны. Ложнооперированные животные подвергались тем же процедурам, за исключением введения бенгальского розового.

Двигательная активность

Для оценки функционального состояния животных исследовали уровень их двигательной активности (ДА) в автоматизированной установке РОДЭО-1, время наблюдения 5 мин. Анализ ДА проводили до и на 9-е сутки после фототромбоза префронтальной коры.

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)

Для выработки УРПИ применялась прямоугольная камера размером 45x23x25 см с акриловыми непрозрачными стенками и электрифицированным металлическим полом. Камера разделена стенкой, имеющей квадратное отверстие 6x6 см, на два равных отсека. В первый день обучения крысу помещали в освещенный отсек (лампа мощностью 100 Вт), обследовав который, она через некоторое время (латентный период (ЛП) до обучения) переходила в темный отсек, после чего дверь в этот отсек камеры закрывали и оставляли там крысу на 5 мин. Через 1 ч процедуру повторяли и крысу сразу извлекали из темного отсека. На следующий день ознакомление повторяли, а затем через час проводили процедуру обучения. При заходе крысы в темный отсек камеры дверь в него закрывали и через металлические прутья пола пропускали электрический ток (1,3 мА, 50 Гц, 5 с). Через 24 ч проводили опрос и УРПИ считали выработанным, если ЛП составлял не менее 300 с. Животных с меньшим ЛП исключали из эксперимента. Сохранение УРПИ проверяли на 9-й день после фототромбоза коры. Животное помещали в светлый отсек и фиксировали время перехода в темную камеру.

Антиамнестический (лечебный) эффект вещества рассчитывали по формуле:

$$A(\%) = \frac{100 \cdot (\text{ЛП}(\text{фототромбоз с веществом}) - \text{ЛП}(\text{фототромбоз}))}{(\text{ЛП}(\text{ложнооперированные}) - \text{ЛП}(\text{фототромбоз}))}$$

Морфометрия

Для морфометрического измерения площади очага серийного среза и объема ишемического повреждения использовали мозг экспериментальных животных, фиксированный методом погружения в смесь формалин — спирт — уксусная кислота (ФУС) в пропорции 2:7:1 на ночь. После фиксации материал переносили на сутки в 70°-ный спирт и

резали в дистиллированной воде на вибротоме 1000 (Tecnic Product international inc., USA) с шагом 100 мкм. Каждый второй срез последовательно монтировали на предметных стеклах, покрытых желатином, окрашивали 0,2%-ным водным метиленовым синим. Далее препараты обрабатывали по стандартной гистологической методике: обезвоживали в спирте восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в балзам. Гистологические препараты сканировали на слайдовой приставке сканера V100 PHOTO (Epson, USA). Этот метод позволяет получить файл с изображением среза мозга нежно-голубого цвета, на котором четко виден очаг ишемического повреждения — темноокрашенный по краю и светлый в середине. Иногда некротическая ткань распадается, в таком случае очагом поражения считали недостающий участок ткани. Для определения площади ишемического повреждения использовали специализированную компьютерную программу Image J («Bethesda», США).

Объем очага повреждения фотоиндуцированным тромбозом определяли по формуле:

$$V = \sum S_n \times d,$$

где:

d — толщина пары срезов (200 мкм);

S_n — измеренная площадь ишемического очага серийного среза (мм²);

Σ — сумма объемов ишемического повреждения на срезах.

Коэффициент эффективности защиты (КЭЗ) рассчитывали по формуле:

$$\text{КЭЗ} = \frac{V_o - V_e}{V_o} \cdot 100\%,$$

где:

V_o — средний суммарный объем очага поражения у животных с введением физраствора;

V_e — средний объем очага поражения у животных с введением вещества.

Этот параметр позволяет сравнивать эффективность действия различных веществ на разных моделях ишемии.

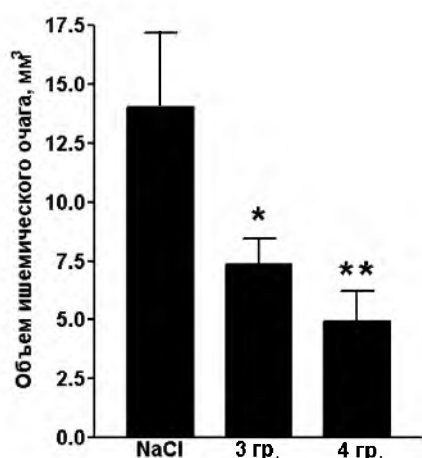
Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 6.0». Нормальность распределения признака в выборке оценивали по W -критерию Шапиро—Уилка. Для сравнения показателей латентного периода в тесте УРПИ использовали U -критерий Манна—Уитни для независимых выборок и критерий Вилкоксона для парных сравнений для связанных выборок. Статистическую значимость различий объемов инфаркта оценивали по t -критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как и ГК-2, пептид ГК-2Н оказался активен на крысиной модели ишемического инсульта. Изучение двигательной активности контрольных и опытных животных в экспериментах с ГК-2Н показало отсутствие статистически значимых различий как до, так и после фокального коркового инфаркта (данные не приводятся).

Было исследовано влияние введения ГК-2Н на сохранение когнитивных функций у крыс после ишемического инсульта. Введение препарата проводили в период «тера-



Влияние ГК-2Н, введенного через 1 ч и 4 ч после фототромбоза (3-я и 4-я группы животных) на объем очага ишемического повреждения; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с группой, получавшей NaCl 0,9% (физиораствор)

пептического окна», т.е. патогенетическая терапия экспериментального острого инсульта была направлена на прерывание быстрых реакций глутамат-кальциевого каскада и уменьшение размеров очага ишемии.

У всех взятых в эксперимент животных до операции был выработан условный рефлекс пассивного избегания

до латентности захода в темный отсек (ЛП) 300 с. После фототромбоза латентный период захода животных в темный отсек уменьшился до 48 с. У 3-й группы крыс, получавших внутривентрикулярно ГК-2Н через 1 ч после операции ЛП сократился до 154 с, а у 4-й группы, получившей ГК-2Н через 4 ч после фототромбоза — до 198 с (табл. 1). Увеличение антиамнестического эффекта при более позднем введении дипептида может быть связано с уменьшением количества эндогенного NGF в это время по сравнению с количеством этого нейротрофина, выбрасываемого сразу после инсульта. На фоне низкой концентрации NGF влияние ГК-2Н может быть более заметно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженном антиамнестическом эффекте препарата ГК-2Н в условиях локальной ишемии мозга, который проявился в значительном сохранении УРПИ, выработанного до фотоиндуцированного тромбоза префронтальной коры.

Морфометрическое исследование показало (рис. 1), что общий объем поражения мозга крысы при фотоиндуцированном тромбозе составил в среднем 14 мм³, что составляет примерно 1% от объема мозга. У леченых животных этот объем снизился до 7,5 мм³ при введении ГК-2Н через 1 ч и до 5 мм³ при введении через 4 ч. Рассчитанный коэффициент эффективности защиты составил соответственно 47% при введении ГК-2Н через 1 ч и 65% при введении через 4 ч после ишемического повреждения ко-

Таблица 1

Антиамнестическое действие ГК-2Н (0,1 мг/кг) при субхроническом внутривентрикулярном введении в условиях ишемического инфаркта мозга. Латентный период в тесте УРПИ на 9-е сутки после фототромбоза префронтальной коры (с)

| Ложнооперированные (1 гр.) | Фототромбоз + физ. р-р (контроль, 2 гр.) | Фототромбоз + ГК-2Н через 1 ч п/о (3 гр.) | Фототромбоз + ГК-2Н через 4 ч п/о (4 гр.) |
|----------------------------|--|---|---|
| 300 | 20 | 300 | 300 |
| 300 | 30 | 15 | 87 |
| 300 | 103 | 90 | 20 |
| 300 | 38 | 60 | 70 |
| 300 | 105 | 300 | 300 |
| 300 | 20 | 300 | 300 |
| 300 | 18 | 15 | 300 |
| 300 | Сред. 48 [#] | Сред. 154*, лечебный эффект 42% | Сред. = 197*, лечебный эффект 60% |
| n=8 | n=7 | n=7 | n=7 |

Примечание. n — число животных в группе; * $p < 0,05$ — достоверное отличие 3-й и 4-й групп от оперированного контроля; [#] $p < 0,05$ — достоверное отличие оперированного контроля от ложнооперированных

Таблица 2

Антиамнестическое действие ГК-2Н, Ноопепта [8] и Семакса [5] на модели фотохимического инсульта

| Экспериментальные группы животных | ГК-2Н, 1 ч п/о, 0,1 мг/кг в/б, m=4 | ГК-2Н, 4 ч п/о, 0,1 мг/кг в/б, m=4 | Ноопепт, 1 ч п/о, 0,5 мг/кг в/б, m=9 | Семакс, 1 ч п/о, 0,25 мг/кг и/н, m=7 |
|--|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| ЛП ложнооперированных животных, с | 300 | 300 | 300 | 300 |
| ЛП контрольных животных с фототромбозом, с | 48 [#] | 48 [#] | 80 [#] | 80 [#] |
| ЛП опытных животных с фототромбозом и веществом, с | 154* | 198* | 200* | 240* |
| Эффективность лечения, А (%) | 42 | 60 | 55 | 73 |

Примечание. п/о — после операции; в/б — внутривентрикулярно; и/н — интраназально; m — число введений препарата. Эффективность лечения рассчитывалась по формуле: $A(\%) = \frac{100 \cdot (\text{ЛП}_{\text{фототромбоз с веществом}} - \text{ЛП}_{\text{фототромбоз}})}{(\text{ЛП}_{\text{ложнооперированные}}) - \text{ЛП}_{\text{фототромбоз}}}$;

* $p < 0,05$ — достоверное отличие от оперированного контроля; [#] $p < 0,05$ — достоверное отличие оперированного контроля от ложнооперированных

Нейропротективное действие ГК-2, Ноопепта [8] и Семакса [5] на модели фотохимического инсульта

| | ГК-2Н, 0,1 мг/кг в/б, m=4 | | Семакс, 0,25 мг/кг и/н, m=7, 1 ч п/о |
|--|---------------------------|---------|--------------------------------------|
| | 1 ч п/о | 4 ч п/о | |
| Объем очага при тромбозе в контроле, V_0 мм ³ | 14 | 14 | 15 |
| Объем очага при тромбозе в опыте, V_E мм ³ | 7,5* | 5,0* | 11* |
| Эффективность лечения, E (%) | 47 | 65 | 27 |

Примечание. п/о — после операции; в/б — внутривенно; и/н — интраназально; m — число введений препарата.
Эффективность лечения рассчитывалась по формуле: $E(\%) = \frac{100 \cdot (V_0 - V_E)}{V_0}$;
* $p < 0,05$ — достоверное отличие от оперированного контроля

ры. Как и в предыдущем случае, более сильный лечебный эффект наблюдается при более позднем первом введении ГК-2Н. Вместе с тем, отмечена хорошая корреляция между объемом поражения мозга и нарушением памяти.

При сравнении эффектов ГК-2Н с влиянием используемых в клинике ноотропов Ноопепта (8) и Семакса [5] видно, что на данной модели ГК-2Н обладает сходным антиамнестическим действием по сравнению с обоими препаратами, но проявляемым в меньших дозах (табл. 2).

При сравнении нейропротективного действия ГК-2Н с Семаксом, используемым в клинике для лечения инсультов, видно, что эффективность лечения ГК-2Н примерно в 2 раза выше, чем у Семакса (табл. 3).

Увеличение эффективности действия ГК-2Н как на память, так и на объем очага поражения при отсроченном введении вещества может быть важно в клинической практике.

Полученные результаты подтверждают установленные в опытах *in vitro* [6] нейропротективные свойства ГК-2Н и свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки препарата в качестве потенциального противоинсультного средства.

Список литературы

1. Болезни нервной системы. Руководство для врачей в 2-х т. / Под ред. Яхно Н.Н., Штульмана Д.Р. 3-е изд-е перераб. и доп. — М.: Медицина, 2003. Т. 1.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф. и др. // Журнал неврологии и психиатрии. — 1997. — №6. — С. 26—34.
3. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / Под ред. З.А. Суслиной, М.А. Пирадова. — М.: Медпресс-Информ, 2008. — 288 с.
4. Романова Г.А. Дизрегуляторное нарушение интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов / Под ред. Г.Н. Крыжановского. — М.: Медицина, 2002. — С. 605—615.
5. Романова Г.А., Силачев Д.Н., Шакова Ф.М. и др. // Бюлл. Экспер. биол. — 2006. — Т. 142, №12. — С. 618—621.
6. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Патент РФ 2410392, Бюл. №3 от 27.01.2011.
7. Connor B., Dragunow M. // Brain. Res. Brain Res. Rev. — 1998. — Vol. 27. — P. 1—39.
8. Ostrovskaya R.U., Romanova G.A., Barskov L.V. et al. // Behav. Pharmacol. — 1999. — Vol. 10, №5. — P. 549—553.
9. Pollack S.J., Harper S.J. // Drug News and Perspectives. — 2002. — Vol. 15, №5. — P. 268—277.
10. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. // Ann. Neurol. — 1985. — Vol. 17, №5. — P. 497—504.

Neuroprotection on experimental ischemic insult of prefrontal areas of the brain cortex

Romanova G.A.

It was shown neuroprotective and anti-amnestic action of GK-2H with comparison to peptides noopept and semax on model bilateral focal ischemic injury of prefrontal areas of the rat brain cortex. It is stated that intraperitoneal injection of GK-2H in dose 0,1 mg/kg on 1 or 4 hours and further on 2-nd, 4-th and 8-th days after operation leads to decrease of volume of cortical infarction to 47% or 65% and restoration of reproduction of passive avoidance reflex acquired before experimental ischemic insult on 42% and 60% accordingly. It was concluded that GK-2H possesses neuroprotective properties.

Key words: nerve growth factor mimetic — GK-2H, phototrombosis, neuroprotection, anti-amnestic action, noopept, semax