

УДК 615.21:616.831-005.4

А. Б. Коршунова, В. И. Инчина,
Н. А. Костычев, И. А. Просвиркина, И. Н. Чаиркин

НЕЙРОПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ОКСИПИРИДИНА И ПИРИМИДИНА ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Аннотация. С помощью функциональных и гистологических методов исследования установлено влияние пирацетама, мексидола, ксимедона, фумарата 3-гидроксипиридина на структурно-функциональные изменения гиппокампа левого полушария головного мозга белых крыс в условиях глобальной ишемии. На основании полученных нами экспериментальных данных исследуемое соединение ксимедон по сравнению с другими исследуемыми соединениями является наиболее приемлемым для выравнивания гомеостаза подопытных животных.

Ключевые слова: ишемия мозга, нейропротекция, гиппокамп, крысы.

Abstract. By means of functional and histological research methods the authors have ascertained the influence of pyracetam, mexidol, xymedon, fumarate 3-hydroxypyridin on structurally functional changes of a hippocampus of the left hemisphere of white rats' brain under conditions of global ischemia. On the basis of the experimental data received the authors conclude that xymedon in comparison with other drugs is the most admissible to homeostasis alignment of experimental animals.

Key words: cerebral ischemia, neuroprotection, a hippocampus, rats.

Введение

По данным Госкомстата Республики Мордовии, смертность населения из-за болезней системы кровообращения составила 845,2 случая на 100 тыс. человек в 2008 г. и 805,3 – в 2009 г.; в том числе от cerebrovasкулярных болезней – 210,5 в 2008 г. (в том числе 172,5 в городе, 267,4 в селе), и 200,6 в 2009 г. (в том числе 160,1 в городе, 262,2 в селе). Внедрение новых эффективных методов лечения позволило снизить летальность, однако около 80 % больных, перенесших инсульт, становятся инвалидами, из них 10 % – тяжелыми инвалидами, нуждающимися в постоянной посторонней помощи [1]. При ишемических инсультах у больных происходит нарушение памяти, что связано с повреждением структуры височной доли, гиппокампа и миндалин, а также мозжечка, коры больших полушарий и таламических ядер.

Для восстановления памяти используют различные ноотропные препараты, которые имеют ряд недостатков и ограничений. Поиск новых фармакологических средств, восстанавливающих нарушенные мнестические функции, представляется нам актуальным.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния ряда отечественных соединений, производных 3-оксипиридина и пиримидина, на морфофункциональные изменения гиппокампа левого полушария головного мозга белых крыс в условиях глобальной ишемии.

В качестве контроля использовали пирацетам, который влияет на внутриклеточные процессы, активизирует окисление глюкозы, усиливает синтез

РНК и протеинов и в организме входит в состав ферментов. В опытных группах в качестве корректоров ишемии применяли 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат (сукцинат 3-ГП) (оказывающий противоишемическое, антистрессорное, кардиопротекторное действие) [2], ксимедон (стимулирующий регенераторную активность) [3], фумарат 3-гидроксипиридина (фумарат 3-ГП) (стимулирующий антирадикальную и антиокислительную активность; на модели аллоксанового диабета с гиперхолестеринемией проявляет гипогликемический и гипохолестеринемический эффекты) [4].

1. Материалы и методы исследования

Работа проводилась на 91 животном (нелинейные половозрелые белые крысы обоего пола) с массой тела 180–220 г, самцы и самки содержались отдельно в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Глобальная ишемия головного мозга воспроизводилась у крыс билатеральной окклюзией общих сонных артерий в сочетании с гипотензией [5]. Животных анестезировали этаминал натрием (40 мг/кг интраперитонеально) в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 МЗ СССР). Понижение артериального давления достигалось применением ганглиоблокатора пентамина (0,1 мл/крысу). Подопытные животные были разделены на пять групп. В течение 3-х суток до моделирования церебральной ишемии I (контрольной) группе животных вводили пирацетам (20 % раствор в ампулах по 5 мл, ОАО «Биосинтез», Россия) в дозе 1600 мг/кг интраперитонеально, затем через 20 мин после билатеральной окклюзии общих сонных артерий, далее ежедневно однократно в течение 7-и суток. В опытных группах на фоне пониженного артериального давления и ишемического нарушения мозгового кровообращения проводилась коррекция повреждений с использованием исследуемых соединений. Во II группе изучалось влияние сукцината 3-ГП в дозе 50 мг/кг интраперитонеально. В III группе в качестве противоишемического корректора использовался ксимедон в дозе 30 мг/кг, в IV группе – фумарат 3-ГП в дозе 50 мг/кг. Интактные крысы, которые на протяжении эксперимента находились на рационе вивария, составили V группу.

Через 24 ч после церебральной ишемии регистрировали количество погибших животных в каждой опытной группе, у выживших белых крыс изучали динамику неврологических нарушений на 1, 3, 5, 7-е сутки после билатеральной окклюзии общих сонных артерий. Проводилась оценка неврологического дефицита с использованием тестов сложного двигательного поведения. Применяли метод регистрации мышечного тонуса в тесте подтягивания на горизонтальной перекладине. В данном тесте животные подвешивались передними лапами на проволоку, натянутую на высоте 20–30 см от поверхности стола. Интактные крысы, имеющие физиологический тонус, быстро подтягивались и удерживались на перекладине четырьмя лапами. Невыполнение этого теста крысами опытных групп свидетельствовало о нарушении мышечного тонуса и неврологическом дефиците. В методе регистрации нарушений координации движения по тесту вращающегося стержня лабораторные крысы помещались на стержень диаметром 6 см и скоростью вращения 8 оборотов в минуту. Неспособность животных удерживаться на вращающемся стержне в течение 1 мин хотя бы один раз из трех попыток учитывается как показатель нарушения этой функции [6].

Белых крыс опытных групп на 7-е сутки после ишемии головного мозга выводили из эксперимента методом декапитации под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг интраперитонеально). Одновременно на 7-е сутки выводили из эксперимента и животных интактной группы. Материалом исследования явился головной мозг белых крыс, который изучался макро- и микроскопически.

Гистологическую структуру мозга исследовали светооптическим методом. Для этого мозг фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Зафиксированные образцы после промывки в проточной воде подвергали обезвоживанию в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин [7] и на ротаторном микротоме получали срезы, которые окрашивали гематоксилином, гематоксилин-эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля.

Так как количество объектов в выборке мало ($n < 30$), нормальность распределения представляется сомнительной и для определения значимости различий полученных результатов целесообразно использовать непараметрические критерии. Для суждения о достоверности различий между двумя выборками применялся непараметрический T -критерий Манна-Уитни и критерий соотношения долей [8, 9]. Различия между выборками признавались статистически достоверными при $p < 0,05$.

2. Результаты исследования и их обсуждение

В контрольной группе через 24 ч после операции летальность составила 59 % (22 крысы из 37), к 7-м суткам этот показатель достиг 78 % (29 животных из 37). В группе, получавшей сукцинат 3-ГП, через сутки после операции наблюдалась гибель 44 % (7 животных из 16), а к 7-м суткам – 50 % (8 крыс из 16). В группе, получавшей фумарат 3-ГП, в течение первых суток погибло 29 % (4 животных из 14), к 7-м суткам от начала развития ишемического инсульта наблюдалась гибель 43 % (6 крыс из 14). В группе, получавшей ксимедон, через 24 ч после воспроизведения глобальной ишемии головного мозга отмечалась гибель 47 % (8 крыс из 17), а к 7-м суткам – 53 % (9 грызунов из 17). Во всех опытных группах критерий соотношения долей по отношению к контрольной группе дал достоверный результат для $p < 0,001$.

Ксимедон в дозе 30 мг/кг достоверно ослаблял нарушения мышечного тонуса у белых крыс на 1-е сутки, к 3-м суткам полностью их устранял (табл. 1).

Изучение динамики нарушения координации движения у белых крыс с ишемическим инсультом показало, что на 1-е сутки постишемического периода нарушение координации движения зарегистрировано у 11–44 % лабораторных крыс, на 7-е сутки – у 0 % выживших грызунов (табл. 2).

При макроскопическом исследовании головной мозг здоровой белой крысы ровного светло-розового цвета, мягкая мозговая оболочка тонкая, прозрачная. Полушария головного мозга симметричны. Миндалины мозжечка хорошо контурированы, с четкими извилинами, на разрезе – дерево жизни.

При макроскопическом исследовании мозга белых крыс на модели глобальной ишемии во всех группах подопытных животных определялось неравномерное увеличение размеров обоих полушарий и мозжечка за счет набухания ткани, которая на разрезах прилипала к лезвию скальпеля. Параллельно в обоих полушариях головного мозга и в мозжечке обнаруживались обширные очаги размягчения молочного цвета, выделяющиеся на фоне белесовато-розового цвета окружающей ткани.

Таблица 1

Влияние исследуемых соединений на восстановление мышечного тонуса белых крыс в тесте подтягивания на горизонтальной перекладине

Группа	<i>n</i>	<i>N</i>	%	<i>n</i>	<i>N</i>	%	<i>n</i>	<i>N</i>	%	<i>n</i>	<i>N</i>	%
Контроль	15	16	94	5	8	63	1	4	25	1	4	25
Сукцинат 3-ГП	5	9	56***	2	8	25	1	4	25	0	4	0
Ксимедон	2	8	25***	0	8	0**	0	4	0	0	4	0
Фумарат 3-ГП	3	10	30***	2	8	25	0	4	0	0	4	0

Примечание. *n/N* – количество неподтянувшихся крыс (*n*) из общего количества (*N*); * – критерий соотношения долей по отношению к контрольной группе дал достоверный результат для $p < 0,05$; ** – для $p < 0,01$; *** – для $p < 0,001$.

Таблица 2

Влияние исследуемых соединений на восстановление координации движения белых крыс по тесту вращающегося стержня

Группа	1-е сутки			3-и сутки			5-е сутки			7-е сутки		
	<i>n</i>	<i>N</i>	%	<i>n</i>	<i>N</i>	%	<i>n</i>	<i>N</i>	%	<i>n</i>	<i>N</i>	%
Контроль	7	16	44	3	8	38	2	4	50	0	4	0
Сукцинат 3-ГП	1	9	11*	0	8	0*	0	4	0	0	4	0
Ксимедон	0	8	0**	0	8	0	0	4	0	0	4	0
Фумарат 3-ГП	2	10	20*	1	8	13	0	4	0	0	4	0

Примечание. *n/N* – количество не удержавшихся на вращающемся стержне крыс (*n*) из общего количества (*N*); * – критерий соотношения долей по отношению к контрольной группе дал достоверный результат для $p < 0,05$; ** – для $p < 0,01$; *** – для $p < 0,001$.

В отдельных случаях выявлялись мелкоочаговые кровоизлияния как в мягкой мозговой оболочке, так и в веществе мозга. При этом миндалины мозжечка изменены по форме и размерам с участками вдавлений на поверхности, что, возможно, связано со сдавлением их в большом затылочном отверстии, что в этих случаях является непосредственной причиной смерти.

При светооптическом исследовании парафиновых срезов, окрашенных гематоксилином, гематоксилин-эозином, толуидиновым синим по Нисслю гиппокамп интактных крыс представлен нейро-глио-сосудистыми полями СА-1, СА-2, СА-3, СА-4. Поле СА-1 отличалось двухслойным строением, в котором были разного типа клетки: круглые с центрально расположенным ядром и четко контурированными ядрышками и нейроны треугольной формы базофильно окрашенные. Границы между клетками сохранены в плотных клеточных лентах, сосудистые компоненты без изменений, в глиальной ткани клетки и сосуды без патологии. Поля СА-2, СА-3, СА-4 не отличались от стандартных гистологических описаний [10].

На 7-е сутки после билатеральной окклюзии общих сонных артерий в группе контроля в клетках основных полей гиппокампа и коры левого полушария головного мозга белых крыс наблюдались явления некротического периода с явлениями начинающейся регенерации. Некробиоз и некроз клеток документировался изменениями ядер и цитоплазмы. В поле СА-1 невозможно различить слои, которые слились в общую плотную гомогенизированную массу нейронов с нарушением границ клеток, что связано с доказанной в научной литературе агрегацией хроматина и повышением электронной плотности [11]. В других клетках наблюдался кариорексис с образованием мелких глыбок хроматина по периферии ядер и кариолизис, который сопровождался просветлением ядер за счет исчезновения хроматина. Пикнотизированные ядра клеток лежали отдельно в виде сморщенных и деформированных темно-синих образований. Отдельные ядра имели треугольную, угловатую форму, нередко вытянутые, ядрышки неразличимы. В сосудах эндотелий и ядра набухшие, что свидетельствовало о повышении сосудистой проницаемости. Между стенкой капилляров и окружающей тканью видны светлые промежутки, которые являлись признаком периваскулярного отека.

На 7-е сутки постишемического периода с параллельным введением сукцината 3-ГП в дозе 50 мг/кг в основных полях гиппокампа наблюдалось преобладание светлых клеток с центрально расположенными прозрачными ядрами и темными ядрышками. Перифокально видны очаги разрозненных нейронов, окруженных светлыми просветами, что связано с перицеллюлярным отеком, который наиболее выражен в окружающей глии. Отдельные глиальные клетки деформированы, лежат разрозненно, среди них встречаются свободно лежащие ядра в состоянии пикноза. По сравнению с группой контроля в рассматриваемых нами полях клетки имеют более четкие границы. В окружающей ткани мозга виден перицеллюлярный отек, поля «кружевного» некротического детрита, пролиферация гипертрофированных глиальных клеток, осуществляющих резорбцию некротической ткани, а также очаги пролиферации фибриллообразующих глиальных элементов, формирующих волокнистые структуры. Повсюду документируется периваскулярный отек, набухание эндотелиальных клеток.

При введении ксимедона в дозе 30 мг/кг к 7-м суткам после экспериментальной церебральной ишемии в поле СА-1 гиппокампа выявлялось раз-

деление на 2 слоя. Небольшие клетки с округлыми ядрами и четкими ядрышками сочетались с полиморфными пирамидными клетками с четкими границами и яркой базофилией. Перифокальный отек выражен незначительно. В окружающей ткани мозга видны «кружевные» очаги некроза меньшего объема, чем в предыдущих сериях, пролиферация гиперхромных нейронов более выражена, чем в предыдущих случаях, с параллельным усилением волокнообразования. Периваскулярный отек не наблюдается.

На 7-е сутки постишемического периода с параллельным введением фумарата 3-ГП в дозе 50 мг/кг клеточная лента состоит из диссоциированных, полиморфных клеток небольшой величины, базофильно окрашенных, в ядрах отсутствуют ядрышки. В единичных участках клеточной гряды гиппокампа видны пустоты, связанные с лизированием клеточного материала. В перифокальных зонах пролиферация большого количества клеток разной величины, среди них выделяются гиперхромные клетки, которые участвуют в резорбции некротизированных участков ткани и волокнообразовании. Периваскулярный отек выражен незначительно.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что все исследуемые нами соединения улучшили функциональное состояние подопытных животных, что документировалось ослаблением неврологического дефицита в тестах сложного двигательного поведения; улучшили структуру гиппокампа и коры головного мозга, что подтвердилось усилением регенераторных процессов в перифокальных зонах, окружающих некротические участки. Наилучший результат получен при введении ксимедона в дозе 30 мг/кг.

Список литературы

1. **Иванова, Г.** Ранняя реабилитация больных церебральным инсультом / Г. Иванова, Е. Петрова, В. Скворцова // *Врач.* – 2007. – № 9. – С. 4–9.
2. **Сариев, А. К.** Кинетика выведения мексидола и его глюкуроноконъюгата с мочой больных / А. К. Сариев, В. П. Жердев, Л. А. Литвинов и др. // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 1999. – № 5. – С. 42–46.
3. **Черепнев, Г. В.** Ксимедон снижает мембранную экспрессию фосфотидилсерина, вызванную проапоптогенным дефицитом сывороточных факторов роста в Т-клетках Jurkat / Г. В. Черепнев, Ф. Керн, Р. С. Гараев // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2002. – № 3. – С. 40–43.
4. **Уланова, Т. В.** Использование новых производных 3-гидроксипиридина с целью коррекции метаболических нарушений при сахарном диабете / Т. В. Уланова и др. // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* – 2009. – № 1 (6). – С. 1315–1317.
5. **Мирзоян, Р. С.** Методические указания по экспериментальному изучению препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени / Р. С. Мирзоян, А. С. Саратиков, М. Б. Плотников, А. В. Топчян, Т. С. Ганьшина // *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* – М.: Медицина, 2005. – С. 332–338.
6. **Воронина, Т. А.** Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ / Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова // *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* – М.: Медицина, 2005. – С. 263–281.
7. **Меркулов, Г. А.** Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 424 с.
8. **Медик, В. А.** Математическая статистика в медицине: учебное пособие / В. А. Медик, М. С. Токмачев. – М.: Финансы и статистика, 2007. – 800 с.

9. **Рябухина, Е. А.** Медицинская статистика и информатика : учебное пособие / Е. А. Рябухина, О. А. Гущина. – Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2005. – 120 с.
10. **Отмахов, Н. А.** Нейронная сеть гиппокампа: морфологический анализ / Н. А. Отмахов // Успехи физиологических наук. – 1993. – № 4 (24). – С. 79–101.
11. **Струков, А. И.** Общая патология человека : рук-во для врачей / А. И. Струков, В. В. Серов, Д. С. Саркисов. – М. : Медицина, 1990. – Т. 1. – 448 с.

Коришунова Анна Борисовна

аспирант, Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева (г. Саранск)

E-mail: akorshunova@nm.ru

Korshunova Anna Borisovna

Postgraduate student, Mordovia State University named after N. P. Ogaryov (Saransk)

Инчина Вера Ивановна

доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фармакологии, Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева (г. Саранск)

E-mail: vinchina@mail.ru

Inchina Vera Ivanovna

Doctor of medical sciences, professor, head of sub-department of clinical pharmacology, Mordovia State University named after N. P. Ogaryov (Saransk)

Костычев Николай Александрович

ассистент, кафедра нормальной физиологии, Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева (г. Саранск)

E-mail: kostnikal@yandex.ru

Kostychev Nikolay Alexandrovich

Assistant, sub-department of normal physiology, Mordovia State University named after N. P. Ogaryov (Saransk)

Просвиркина Ирина Александровна

аспирант, Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева (г. Саранск)

E-mail: irishechka_82@mail.ru

Prosvirkina Irina Alexandrovna

Postgraduate student, Mordovia State University named after N. P. Ogaryov (Saransk)

Чаиркин Иван Николаевич

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной анатомии, Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева (г. Саранск)

E-mail: chairkin@rambler.ru

Chairkin Ivan Nikolaevich

Doctor of medical sciences, professor, head of sub-department of normal anatomy, Mordovia State University named after N. P. Ogaryov (Saransk)

УДК 615.21:616.831-005.4

Коршунова, А. Б.

Нейропротективная активность некоторых производных 3-окси-пиридина и пиримидина при глобальной ишемии головного мозга в эксперименте / А. Б. Коршунова, В. И. Инчина, Н. А. Костычев, И. А. Просвиркина, И. Н. Чаиркин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2011. – № 2 (18). – С. 41–47.