

**В.Й.Мамчур
Н.В.Журавель**

Дніпропетровська державна
медична академія

Ключові слова: експериментальний ішемічний інсульт, гербелі, фенібут, неврологічний дефіцит, нейроморфометрія, міжпівкульові відмінності.

Надійшла: 16.01.2008

Прийнята: 04.03.2008

УДК 616.831-005.4:615.214:612.822]-092.9

ВИЗНАЧЕННЯ МІЖПІВКУЛЬОВОЇ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОЇ ДІЇ НООТРОПНОГО ЗАСОБУ ФЕНІБУТ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІШЕМІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ У ГЕРБЕЛІВ

Резюме. У дослідях на монгольських гербелах проводилося вивчення нейропротекторних властивостей ноотропного препарату фенібут. Патологія вивчалася на загальноприйнятій моделі для даного виду лабораторних тварин з урахуванням особливостей їх мозкового кровообігу (ішемія з реперфузією). Досліджувався вплив препарату на терміни регресу неврологічного дефіциту у гербелів з ішемічними інсультами півкульової локалізації. Проведено гістоморфологічне вивчення впливу ноотропа на відновлення нервової тканини в ранні терміни ішемії. На 4-у добу інсульту вивчалася морфологічний стан нейронів і вміст РНК в них. Встановлені міжпівкульові відмінності у впливі фенібуту на відновлення нейронів кори правою і лівою гемісфери. Виявлена тенденція до ефективнішого відновлення нервової тканини правої гемісфери під впливом фенібуту за наявності симетричних вогнищ інфаркту мозку. Отримані дані можуть бути використані при розробці раціональних схем лікування патології мозку з півкульовою локалізацією.

Морфологія.- 2008.- Т.ІІ, №2.- С.30-34.

© В.Й.Мамчур, Н.В.Журавель, 2008

Mamchur V.I., Zhuravel' N.V. Determination of interhemispheric neuroprotective action of the cognitive enhancer Phenibute at an experimental ischemic stroke in Gerbils.

Summary. In experiments on Mongolian gerbils the study of neuroprotective properties of the cognitive enhancer Phenibute was conducted. Pathology was studied on the generally accepted model for this type of laboratory animals taking into account the features of the cerebral blood circulation (ischemia and reperfusion). The influence of preparation was explored on the terms of regress of neurological deficit in gerbils with the hemispheric localization of ischemic strokes. A neuromorphological study is conducted influence of nootrop on renewal of nervous fabric in the early terms of ischemia. On the 4th days of ischemia the morphological and functional condition of neurons and maintenance of PNA in them was studied. Some interhemispheric influencing distinctions of Phenibute on renewal of neurons of bark right and left hemispheres were sited. A tendency is exposed to more effective renewals of nervous fabric of right hemisphere under influencing of Phenibute at presence of symmetric hearths of cerebral infarct. Findings can be used for development of rational charts of treatment of pathology of brain with hemispheric localization.

Key words: experimental ischemic stroke, gerbils, Phenibute, neurological deficit, neuromorphological research, interhemispheric distinctions.

Вступ

На даний час актуальним розділом медичних наук є нейрофармакологія. Неврологічна патологія являється однією з ведучих причин захворюваності та смертності в усьому світі. В структурі захворюваності ішемічний інсульт півкульової локалізації посідає перше місце серед цереброваскулярних неврологічних захворювань (Andlin-Soboci P. et al., 2005; Волошин П.В. та співавт., 2006), що обумовлює необхідність експериментальних розробок щодо оптимізації лікування патології з урахуванням переважного впливу фармакологічних засобів на ту чи іншу гемісферу головного мозку.

Морфологічно інфаркти мозку – це вогнища повного некрозу. Локалізація інфарктів здебіль-

шого належить до басейну судини з повністю закритим або різко звуженим просвітом. Інфаркт мозку, що виник, підлягає ряду морфологічних змін, які можна поділити на 3 стадії (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001). На початку формування інфаркту при макроскопічному дослідженні тканина мозку у вогнищі некрозу представляється дряблою та блідою. На ранніх стадіях структура мозку ще збережена. Зміни спостерігаються лише у нейронах. В мієлінових оболонках відбувається набряк, вакуолізація, виникає фрагментація, а згодом і розпад нервових волокон. На другій стадії некротизована тканина підлягає розплавленню та резорбції, починаються процеси організації інфаркту. Наприкінці першої доби починаються репаративні процеси. Завдяки

впливу протеолітичних ферментів, які виділяють лейкоцити, проходить розплавлення некротизованої тканини. У третій стадії закінчуються репаративні процеси у зоні інфаркту.

В останні роки були знайдені нові патофізіологічні явища, які характерні для порушень мозкового кровообігу, зокрема концепція «ішемічної півтіні», або «пенумбри», а також цереброваскулярного резерву, з яким пов'язані перспективи відновлення порушених функцій (T.-Y. Lee et al., 2006).

В лікуванні ішемічного інсульту важливе місце належить засобам з ноотропними властивостями, але їх вплив на процеси нейропротекції в різні терміни ішемії, а також можлива латералізація дії нейротропних препаратів не беруться до уваги клініцистами та не мають експериментального обґрунтування.

Нами був проведений ряд експериментальних досліджень на білих щурах стосовно виявлення ноотропних засобів з певною переважною латералізацією дії (Журавель Н.В., Мамчур В.Й., 2007; Журавель Н.В. та співавт., 2007), на даному етапі наукових розробок більш виразну латералізацію дії при досить активному нейропротективному впливі показав препарат фенібут. Тож, виникла ідея з метою перевірки та можливого перегляду отриманих даних, відтворити умови експериментального ішемічного інсульту на іншому типі лабораторних тварин – монгольських гербелів (*Meriones unguiculatus*), які за даними літератури останніх років найчастіше використовують у дослідках стосовно порушень мозкового кровообігу, що пов'язано з роз'єднанням великого кола кровообігу та слабо розвинутою системою колатерального кровообігу в цих тварин (Li Q. et al., 2004; J. H. Choi et al., 2007).

Метою даного дослідження була реєстрація впливу фенібуту на розвиток неврологічного дефіциту у гербелів при експериментальному інсульті та можливе виявлення закономірностей змін нейрогістоморфологічних показників на різних етапах ішемії мозку під впливом ноотропу, що досліджується, з урахуванням міжпівкульових відмінностей.

Матеріали та методи

Дослідження були проведені на статевозрілих монгольських гербелах масою 120-150 г. Усі тварини утримувалися на стандартному раціоні віварію (Кожемякін Ю.М. та співавт., 2002). Проводились дослідження на гербелах з тимчасовою двобічною оклюзією каротидних артерій, або ішемією з реперфузією. Ноотропний засіб фенібут вводили з першої доби ішемії відповідно до попереднього експерименту на щурах щоденно на протязі 18 діб з першої доби після моделювання патологічного стану в дозі 250 мг/кг інтраперітонеально. Ознаками адекватності методики експериментальної ішемії головного мозку була наявність неврологічного дефіциту

та дефіциту кровопостачання, першим проявом якого було візуальне порушення кровотоку лівого ока. В наших дослідках одразу після пережимання сонної артерії реєстрували різке поблідіння лівого ока у порівнянні з правим, спостерігали розширення зіниці з припиненням реакції її на світло та згасанням очних рефлексів. У гербелів розвивався неврологічний дефіцит, який проявлявся парезами та паралічами кінцівок, птозом, м'язовим гіпертонусом. Для уніфікаційної оцінки стану лабораторних тварин проводили оцінку неврологічних порушень за шкалою С.Р. McGraw (С.Р. McGraw, 1977), де оцінюється неврологічний дефіцит тварин з ішемічним ушкодженням за добою в балах. Для морфологічних досліджень у тварин після декапітації витягувалися ліва та права півкуля головного мозку, потім 24 години фіксувалися в 10% рідині Буена (Пирс Э., 1962), ділі за стандартною схемою поміщалися в парафінові блоки, з яких готували 5-мікронні гістологічні зрізи в області постцентральної звивини (соматосенсорна кора). Для вивчення морфофункціонального стану нейронів IV-V шарів кори мозку гістологічні зрізи депарафінували та фарбували галоціанін-хромовими квасцями за Ейнарсоном для специфічного виявлення РНК. Зображення кори мозку отримували на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина) та за допомогою 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VI-DAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Морфометричний аналіз клітин мозку здійснювали в автоматичному режимі за допомогою макропрограми, розробленої в спеціалізованому середовищі програмування VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина). Визначали наступні показники:

- щільність нейронів (кількість клітин на 1 мм^2 площі зрізу кори мозку);
- площу тіл нейронів (мкм^2);
- концентрацію РНК в нейронах (одиниці оптичної щільності, $E_{\text{оп}}$).

Відмінності між групами оцінювали статистично з використанням параметричного критерію Ст'юдента за допомогою програми "Biostat" і MS Excell. Вірогідними вважали відмінності з рівнем значущості більше 95% ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення

Визначена виживаність тварин у різних експериментальних групах: контрольній – у тварин з двобічною ішемією загальних сонних артерій, яким на протязі експерименту вводився фізіологічний розчин, та групі гербелів з ішемією, яким з першої години ішемії вводився фенібут. Досліджено, що після проведеної ішемії з реперфузією на першу добу вижили всі тварини обох груп, на 4-ту добу експерименту вижило 70% тварин контрольної групи та 90% тварин, що отримували фенібут. При оцінці неврологічного дефіциту

були отримані такі дані (див. табл. 1)

Таблиця 1

Динаміка неврологічного дефіциту у гербелів з ішемічним ураженням ЗСА у різні терміни при застосуванні фенібуту

| Експериментальні групи | Середній бал за шкалою McGraw | | |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
| | 1-а доба | 4-а доба | 18-а доба |
| Контроль (оклюзія без лікування) | 4,30 ± 0,45 | 6,14 ± 0,55 | 4,00 ± 0,30 |
| Оклюзія + фенібут | 3,40 ± 0,40 | 4,00 ± 0,37* | 1,89 ± 0,39* |

Примітка: * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Слід зазначити, що ішемія призводить до суттєвого неврологічного дефіциту в першу добу експерименту, але відмічається наростання неврологічної симптоматики з максимальним проявленням до 4-ої доби після реперфузії. Відмічено, що погіршення стану тварин з 1-ої до 4-ої доби відображається збільшенням балів за відповідною шкалою, причому в групі контролю це погіршення складає 30%, а у гербелів, які з перших годин порушення кровообігу отримували фенібут – 15%. При подальшому спостереженні за тваринами при виконанні умов експерименту відмічені більш істотні міжгрупові відмінності. В обох групах спостерігався регрес неврологічної симптоматики – в групі контролю дефіцит 18-ої

доби дорівнював вихідним даним першої доби експерименту, в групі фенібуту було значне покращення показників на 45% у порівнянні з першою та на 53% у порівнянні з 4-ою добою експерименту ($P < 0,05$).

Інший етап роботи передбачав вивчення основних гістоморфологічних показників нейронів кори на початку 4-ої доби ішемії - реперфузії у контрольній групі у порівнянні зі псевдооперованими (інтактними) тваринами та у групі гербелів, котрі лікувались фенібутутом у порівнянні з групою контролю, в якій вводили фізіологічний розчин. В усіх групах тварин вивчали щільність нейронів, площу тіл нейронів, вміст РНК (таб.2).

Таблиця 2

Результати вивчення основних характеристик нейронів зони ішемії головного мозку гербелів на початку 4-ї доби після реперфузії

| Експериментальні групи | Щільність нейронів, клітин/мм ² | Площа тіл нейронів, мкм ² | Вміст РНК у нейронах, E _{оп} |
|--------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Інтактні (права півкуля) | 1276 ± 16 | 75,1 ± 0,57 | 8,75 ± 0,09 |
| Інтактні (ліва півкуля) | 1280 ± 11 | 69,87 ± 1,3 | 8,61 ± 0,11 |
| Контроль (права півкуля) | 1023 ± 17** | 56,4 ± 0,9** | 5,2 ± 0,14** |
| Контроль (ліва півкуля) | 1017 ± 6** | 54,8 ± 1,08** | 5,01 ± 0,12** |
| Фенібут (права півкуля) | 1144 ± 23* | 65,6 ± 0,23* | 7,15 ± 0,16* |
| Фенібут (ліва півкуля) | 1110 ± 13* | 61,1 ± 0,77* | 6,82 ± 0,14* |

Примітки: * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю, ** - $p < 0,05$ по відношенню до інтактних тварин.

Так, за показником щільності нейронів відмічено, що взагалі групі контролю при проведенні зворотної оклюзії дещо більше страждають тканини лівої гемісфери мозку – зниження щільності на 21% зліва та 19% справа ($P < 0,05$). В групі гербелів, яким проводилось лікування фенібутутом відновлення тканин мозку проходило дещо краще у правій гемісфері – збільшення щільності нейронів по відношенню до контролю складало 11% праворуч та 9% ліворуч.

Зображення зрізів IV-V шарів кори головного мозку гербелів контрольної групи та групи, що отримували лікування фенібутутом, представлені на рисунках 1-2.

За показником площі тіл нейронів відмічено вірогідне зниження показника на 25% справа та

10% зліва в контрольній групі тварин. Спостерігається також деякий пріоритет у відновленні площі нейронів на 14% праворуч та 10% ліворуч по відношенню до показників контрольної групи гербелів.

Судячи зі зменшення кількості РНК у нейронах в умовах ішемії-реперфузії, то відмічається зниження РНК в середньому на 40% у нейронах лівої гемісфери, та на 42% у нейронах правої гемісфери ($P < 0,05$), а відновлення відбувається з умовною перевагою правої гемісфери (27,3% праворуч проти 26% ліворуч).

Результати проведених досліджень на монгольських гербелах мають певну кореляцію з даними попередніх робіт щодо впливу ноотропів на зону інфаркту мозкової тканини та дають мо-

жливість зробити наступні висновки.

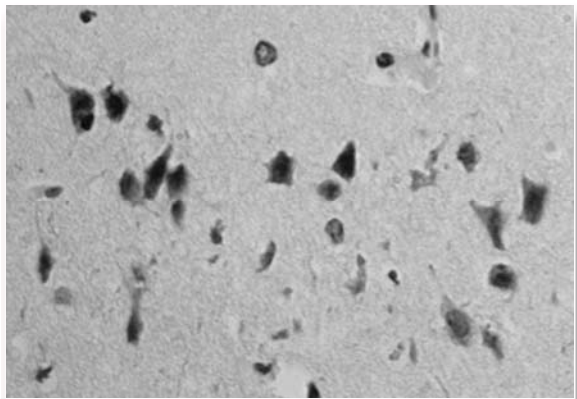


Рис. 1. Зображення IV-V шарів кори головного мозку гербела з на 4-ту добу експериментального інсульту без лікування.

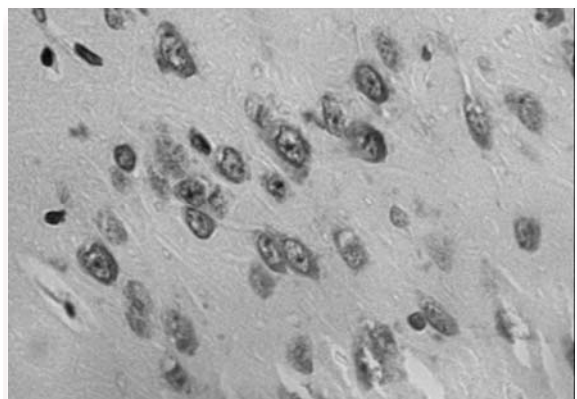


Рис. 2. Гістологічний зріз IV-V шарів кори головного мозку гербела при щоденному лікуванні ноотропним засобом фенібут у дозі 250 мг/кг.

Висновки

Моделювання гострого порушення мозкового кровообігу за ішемічним типом у монгольських гербелів шляхом двобічної оклюзії загальних сонних артерій протягом 15 хвилин з наступною реперфузією супроводжується характерними білатеральними морфофункціональними змінами в нервовій тканині.

Підтверджений позитивний вплив фенібуту на регрес неврологічної симптоматики при призначенні препарату у ранні терміни при експериментальному ішемічному інсульті у лабораторних тварин.

Відмічений нейропротективний вплив препарату фенібут на відновлення нервових клітин головного мозку, які були уражені внаслідок експериментальної ішемії; прослідкована певну тенденція до більш виразного покращення показників правої гемісфери при призначенні фенібуту з першої доби порушення кровообігу.

Перспективи подальших розробок

Важливим питанням сьогодення є оптимізація лікування неврологічних захворювань півкульової локалізації, в терапії яких застосовуються ноотропи. Наведені дані є частиною досліджень по встановленню наявності або відсутності латералізації дії ноотропних засобів та потребують подальших наукових та дослідницьких підтверджень, які планується знайти.

Літературні джерела

Волошин П.В., Міщенко Т.С., Лекомцева Є.В. Аналіз поширеності та захворюваності на нервові хвороби в Україні // Международный неврологический журнал.- 2006.- Т.3, №7.- С.9-13.

Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга.- М.: Медицина, 2001.- 328 с.

Журавель Н.В., Мамчур В.Й. Комплексна характеристика морфологічних змін нервової тканини в умовах експериментальної ішемії головного мозку на тлі застосування ноотропних засобів // Морфологія.- 2007.- Т.1, №3.- С.21-26.

Журавель Н.В., Мамчур В.Й., Беленічев І.Ф. Особливості міжпівкульової нейропротекторної дії пірацетаму і фенібуту за даними морфометричного аналізу // Одеський медичний журнал.- 2007.-Т.5, №103.- С.13-18.

Науково-практичні рекомендації з утриман-

ня лабораторних тварин та роботи з ними / Кожемякін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайретдінова Т.А.- Київ, 2002.- 155 с.

Пирс Э. Гистохимия.- М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1962.- 962 с.

Age-related changes in ionized calcium-binding adapter molecule 1 in the gerbil hippocampal CA1 region / Choi J. H., Lee Ch. H., Chung D.W. et al. // Neurosci Res.- 2007.- Vol.58, №1.- P.74-78.

Cerebral Blood Flow Threshold of Ischemic Penumbra and Infarct Core in Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review / Lee T.Y., Murphy B. D., Aviv R. I. et al. // Stroke.- 2006.- Vol.37, №9.- P.946-954.

Cost of disorders of the brain in Europe / Andlin-Soboci P., Jonson B., Wittchen H., Olesen J. // European Journal of Neurology.- 2005.- №12.- P.1-27.

McGraw C.P. Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils // Arch.Neurol.- 1977.- №34.- P.334-336.

Neuroprotection of catalpol in transient global

ischemia in gerbils / Li Q., Duan Y.-L., Bao Y.-M. et al. // Neuroscience Research.- 2004.- Vol.50.- P.169-177.

Мамчур В.И., Журавель Н.В. Определение межполушарного нейропротективного действия ноотропного препарата фенибута при экспериментальном ишемическом инсульте у гербелов.

Резюме. В опытах на монгольских гербелах проводилось изучение нейропротекторных свойств ноотропного препарата фенибут. Патология изучалась на общепринятой модели для данного вида лабораторных животных с учетом особенностей мозгового кровообращения (ишемия с реперфузией). Исследовалось влияние препарата на сроки регресса неврологического дефицита у гербелов с ишемическими инсультами полушарной локализации. Проведено гистоморфологическое изучение влияния ноотропа на восстановление нервной ткани в ранние сроки ишемии. На 4-е сутки инсульта изучалось морфофункциональное состояние нейронов и содержание РНК в них. Установлены межполушарные различия во влиянии фенибута на восстановление нейронов коры правой и левой гемисферы. Выявлена тенденция к более эффективному восстановлению нервной ткани правой гемисферы под влиянием фенибута при наличии симметричных очагов инфаркта мозга. Полученные данные могут быть использованы при разработке рациональных схем лечения патологии мозга с полушарной локализацией.

Ключевые слова: экспериментальный ишемический инсульт, гербелы, фенибут, неврологический дефицит, нейроморфометрия, межполушарные различия.