

ЗАСТОСУВАННЯ МОДЕЛІ ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ДЛЯ ОЦІНКИ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПЕПТИДНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (м. Київ)

Дослідження є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Органи нервової, імунної та сечостатевої системи в умовах експериментального пошкодження», № держ. реєстрації 0112U001413.

Вступ. Судинні захворювання головного мозку є важливою та актуальною медико-соціальною проблемою сучасності. У світі понад 9 млн. людей страждають від гострих та хронічних цереброваскулярних захворювань, основне місце серед яких займають інсульти. Саме це визначає актуальність пошуку нових підходів до терапії цереброваскулярної патології різного ґенезу в цілому, та геморагічного інсульту зокрема [4].

Від загальної кількості випадків гострої недостатності мозкового кровообігу первинні інсульти складають у середньому 75%, повторні – близько 25%. За останні десятиліття спостерігається подвоєння частоти інсультів у віковій групі після 45 років. Після перенесеного інсульту спостерігаються тяжкі ускладнення, що супроводжуються моторними, мовних та мнестичними розладами, а до активного способу життя повертається лише 10-15% реконвалесцентів, близько 60% осіб стають інвалідами [6].

У зв'язку з цим актуальним питанням клінічної на фундаментальній нейронауки залишається дослідження патогенезу захворювання з метою

підвищення ефективності лікування і подальшого удосконалення системи нейрореабілітації пацієнтів, особливо в гострий період інсульту [1,3].

Метою роботи було вивчення структурних змін кори великого мозку при експериментальному геморагічному інсульті, оцінити ефективність пептидних лікарських засобів за умов застосування запропонованої моделі інсульту.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальне дослідження проведено на 40 щурах-самках (середня маса $203,1 \pm 7,5$ г), яким моделювали геморагічний інсульт. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Моделювання одностороннього геморагічного інсульту полягає у відтворенні локальної гематоми в ділянці правої внутрішньої капсули головного мозку щурів шляхом її механічного руйнування (capsula interna dextra, L=3,5-4,0; H=6,0; AP=0,6-1,0) (рис. 1) [2]. Після завершення проведення оперативного втручання рану в ділянці мозкового черепа зашивали наглухо поліамідними нитками 2 USP (Олімп, Україна) і обробляли 5% спиртовим розчином йоду.

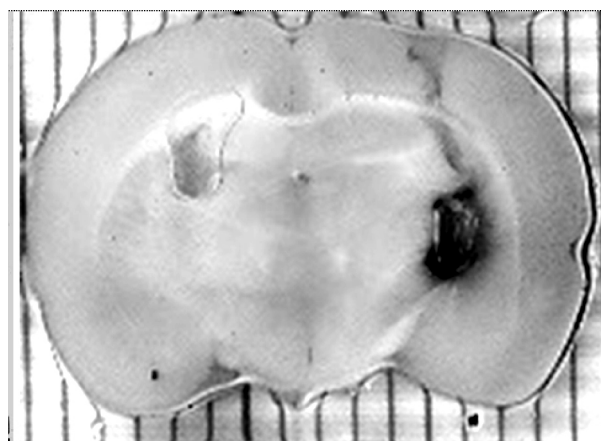
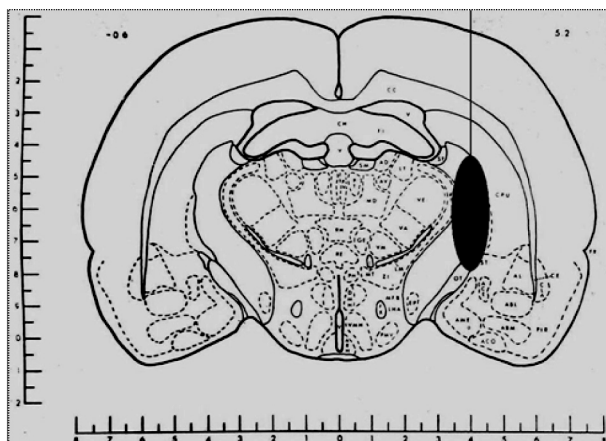


Рис. 1. Спосіб моделювання геморагічного інсульту. Интрацеребральна гематома в ділянці внутрішньої капсули.

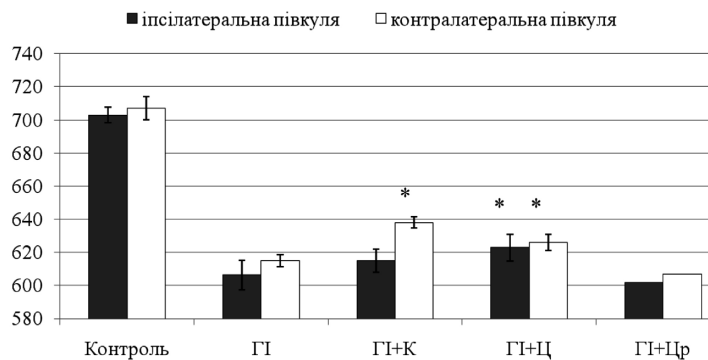


Рис. 2. Щільність нейронів кори головного мозку щурів при геморагічному інсульті (клітин/мм²).

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з ГІ; ГІ – геморагічний інсульт; К – кортексин; Ц – церебрал; Цр – церебролізін.

Прооперовані тварини розділили на чотири підгрупи, трьом із яких вводили лікарські засоби: церебролізін (Евеве, Австрія) інтраперитоніально в дозі 100 мг/кг, кортексин (Герофарм, Росія) – внутрішньом'язово в дозі 2,5 мг/кг, церебрал ("Дніпрофарм", Україна) – інтраназально в дозі 0,1мг/кг. Лікарські засоби вводили тваринам впродовж 10 днів після моделювання повторного інсульту.

Через 10 днів після моделювання локального гострого геморагічного інсульту (в ділянці С. І. dextra) у дослідних щурів проведено забір ділянок кори

великого мозку іпсілатеральної та контралатеральної півкулі на рівні ділянки введення канюлі. Зразки кори великого мозку фіксували в 2,5% розчині глутаральдегіду з наступним фіксуванням в 1% розчині осмієвої кислоти на фосфатному буфері (рН 7,4). Матеріал зневоднювали в спиртах висхідної концентрації і заливали в суміш епоксидних смол епон-аралдит. Із епоксидних блоків виготовляли ультратонкі зрізи на ультратомі Рейхарт. Для підвищення контрастності ультратонкі зрізи забарвлювали розчином уранілацетата і цитратом свинцю і досліджували в електронному мікроскопі JEM-100В (Японія). Головний мозок фіксували в 10% нейтральному формаліні, виготовляли криозрізи та імпрегнували азотнокислим сріблом.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати досліджень морфологічних і статистичних показників кори мозку у щурів, яким не вводили лікарські засоби, свідчать про те, що при моделюванні гематоми і порушенні церебральної гемодинаміки відбуваються набряк тканини мозку і нейродегенеративні процеси (**рис. 2**). Перичелюлярні і периваскулярні набряки призводять до формування системного набряку головного мозку

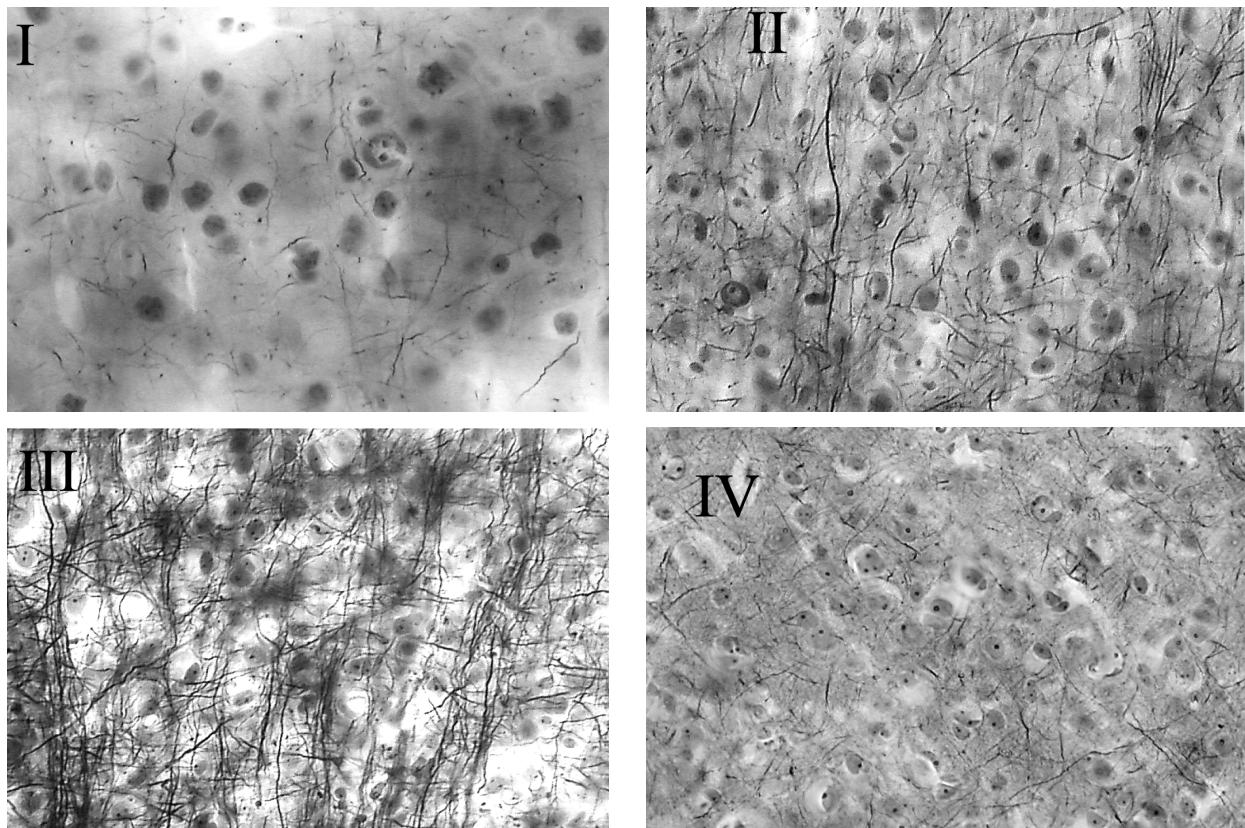


Рис. 3. Мікрофотографія кори іпсілатеральної півкулі при односторонньому геморагічному інсульті.

I – контрольна група; II – інсульт+кортексин; III – інсульт+церебрал; IV – інсульт+церебролізін.

Імпрегнація сріблом. Об. 40, ок. 12.

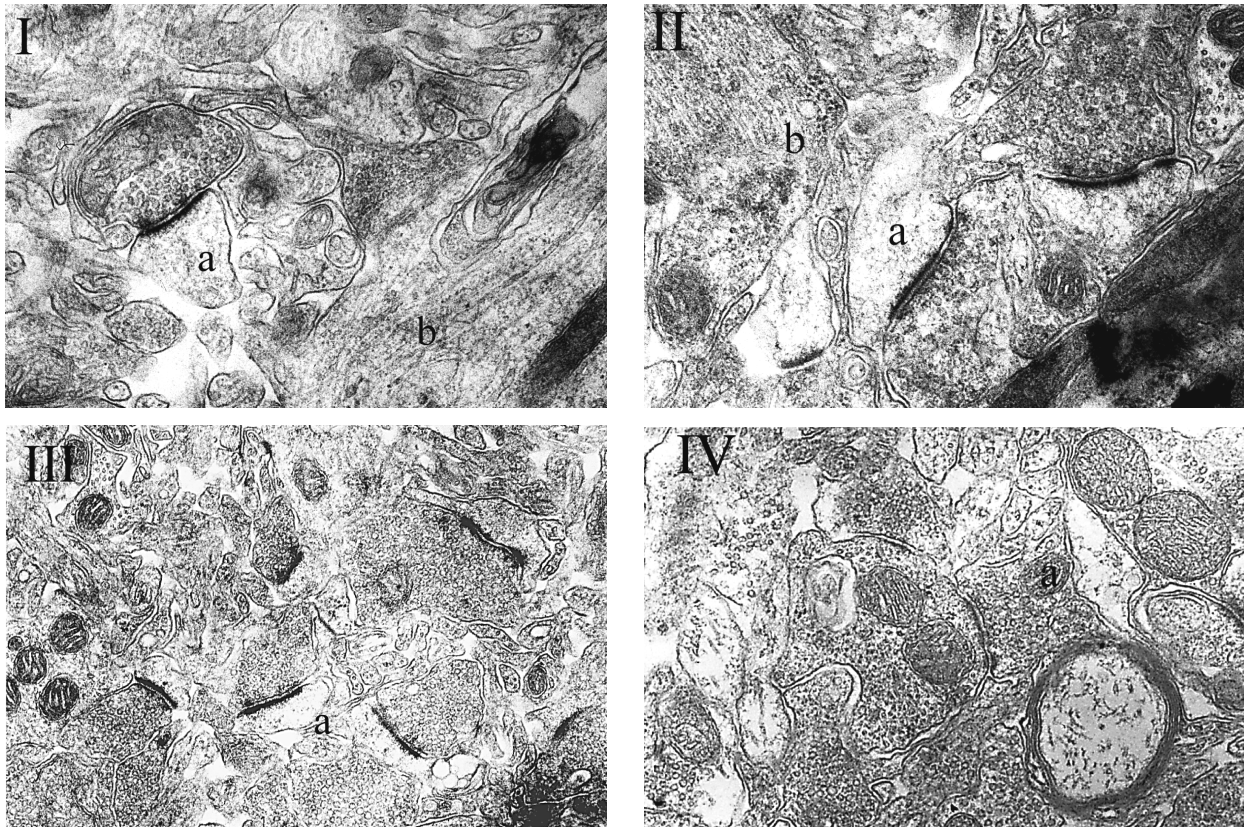


Рис. 4. Кора іпсілатеральної півкулі при односторонньому геморагічному інсульті. I – контрольна група; II – інсульт+кортексин; III – інсульт+церебрал; IV – інсульт+церебролізин: а – синапс; б – дендрит. Електронорама: 20000. .

та порушенні щільності нервових волокон (рис. 3), загибель нейронів кори мозку досягає 13-15%. При електронномікроскопічному дослідженні встановлено набряк нейритів, деструкцію синапсів та редукція органел нейронів (рис. 4). В апікальних дендритах нейронів реєстрували лише поодинокі мікротрубочки та виражений кристалізм мітохондрій, що свідчить про деструкцію цитоскелету нейритів при порушенні церебральної гемодинаміки.

При введенні кортексину встановлено незначне зменшення кількості загиблених клітин в контралатеральній півкулі головного мозку щурів. Щільність нейронів в контралатеральній півкулі становила $638,1 \pm 3,5$ клітин/мм², в той час як у тварин, що не отримували препарати – $615,3 \pm 7,1$ клітин/мм². Встановлено зростання щільності кортикальних нервових волокон, відновлення міжнейрональних контактів. Реєстрували неушкоджені апікальні дендрити пірамідних нейронів, значна кількість мікротрубочок. В деяких дендритах відсутні системи мікротрубочок, присутні змінні мітохондрії. В пресинаптичних закінченнях локалізовані групи щільно розташованих везикул, що може свідчити про порушення організації цитоскелету, та функціонування пресинаптичних закінчень (рис. 4).

При введенні церебралу щільність нейронів в іпсілатеральній півкулі становила $623,5 \pm 6,9$ клітин/мм², що достовірно менше показників тварин, що

не отримували фармакологічних засобів. Відмічено відновлення нервових волокон в цереброкортесі, реєстрували радіальні та тангенціальні нервові волокна. При електронномікроскопічному дослідженні відмічено збереження ультраструктурної організації синапсів. В постсинаптичних закінченнях реєстрували поодинокі філаменти, везикул та неушкоджені мітохондрії. В пресинаптичних закінченнях локалізувалися значна кількість синаптичних везикул (рис. 4).

При введенні церебролізину щільність нейронів в іпсілатеральній півкулі склала $296,9 \pm 6,3$ клітин/мм², тобто достовірно не відрізнялась від групи тварин, що не отримували лікарських засоби. Значного зростання кількості кортикальних нервових волокон також не встановлено. Встановлено значну кількість ушкоджених синаптичних контактів з ознаками деструкції мікротрубочок в дендритах та аксонах. В синаптичних закінченнях зустрічали мітохондрії та значну кількість щільно розташованих синаптичних везикул.

Таким чином, отримані результати свідчать про розвиток гострих патологічних змін головного мозку, застосування лікарських засобів не завжди дає змогу отримати бажаних захисний вплив на цитологічні утворення мозку при інсульті, що стає причиною розвитку неврологічного дефіциту. Як свідчать отримані нами дані, основним чинником незадовільної фармакотерапії є деструктивні зміни

кори мозку на тлі набряку нейронів та їх нейритів. Застосування пептидних лікарських засобів в різній мірі попереджає порушення міжнейрональних контактів та забезпечує процеси пластичності в ушкодженій корі мозку [5,7,9].

Висновки.

1. Встановлено, що 10-ти денне курсове введення кортексину і церебралу запобігає розвитку деструкції міжнейрональних синапсів і нейродегенерації на тлі набряку мозку при експериментальному інсульті. Застосування церебралізіну достовірно не вплинуло на відновні процеси при геморагічному інсульті.

2. Збереження та відновлення міжнейрональних синапсів забезпечує пластичні зміни мозку, в основі яких ремоделювання або зміна архітекtonіки нервових волокон. Стимуляція нейропластичності за допомогою лікарських засобів видається перспективним підходом. Крім цього, інтраназальний спосіб

введення препарату церебрал зручний в порівнянні із застосованими парентеральними системами доставки ліків (drug delivery systems) в організм.

3. Застосування запропонованої експериментальної моделі геморагічного інсульту розширює уявлення про розвиток патологічних змін при цереброваскулярній патології. Модель може бути використана для дослідження антиінсультної дії препаратів різних фармакологічних груп.

Перспективи подальшого досліджень. В подальшому планується розробка методу комплексної оцінки фізіологічних показників функціонального відновлення уражених відділів мозку при інсульті та за умов застосування фармакологічних засобів. Такі дослідження є необхідними для впровадження перспективних лікарських засобів, доклінічної оцінки їх дії та дозволяють отримати нові дані у вивченні неврологічного дефіциту.

Література

1. Гамалій Т. П. Особливості перебігу раннього відновного періоду у хворих з півкульовим ішемічним інсультом, який супроводжується внутрішньомозковими ускладненнями : автореф. дис... на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14. 01. 15 «Нервові хвороби» / Тетяна Петрівна Гамалій, Інститут неврології, психіатрії та наркології АМН України. – Харків, 2005. – 19 с.
2. Макаренко А. Н. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных / А. Н. Макаренко, Н. С. Косицын, Н. В. Пасекова, М. М. Свинов // Журн. высш. нервн. деятел. – 2002. – Т. 52, № 6. – С. 765-768.
3. Міщенко В. М. Постінсультні стани у хворих на ішемічні порушення мозкового кровообігу : автореф. дис... на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14. 01. 15 «Нервові хвороби» / Владислав Миколайович Міщенко, Інститут неврології, психіатрії та наркології АМН України. – Харків, 2006. – 18 с.
4. Творогова Т. В. Влияние нейропептидов производных тафтина на динамику формирования внутримозговой гематомы и функциональное восстановление в условиях экспериментального геморрагического инсульта у крыс : автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук : спец. 14. 01. 15 «Нервные болезни» / Т. В. Творогова. – М., 2009. – 25 с.
5. Chollet F. Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial / F. Chollet, J. Tardy, J. F. Albucher [et al.] // Lancet Neurol. – 2011. – Vol. 10(2). – P. 123-130.
6. Garcia-Alloza M. Cerebrovascular lesions induce transient α -amyloid deposition / M. Garcia-Alloza, J. Gregory, K. Kuchibhotla [et al.] // Brain. – 2011. – Vol. 134, № 12. – P. 3697-3707.
7. Luft A. R. Physiological basis of rehabilitation therapeutics in stroke / A. R. Luft, C. Hafer-Macko, T. Schallert // Stroke recovery and rehabilitation. – New York, USA : Demos Medical Publishing, 2009. – P. 145-152.
8. Paxinos G. . The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. San Diego: Academic Press, 2008. – 400 p.
9. Zhang C. . Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke / C. Zhang, M. Chopp, Y. Cui [et al.] // J. Neurosci Res. – 2010. – Vol. 88. – P. 3275-3281.

УДК 616. 831-005. 1-005. 4-036

ЗАСТОСУВАННЯ МОДЕЛІ ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ДЛЯ ОЦІНКИ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПЕПТИДНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Савосько С. І.

Резюме. Досліджено морфологічні зміни головного мозку при експериментальному геморагічному інсульті. Визначено показники загибелі кортикальних нейронів іпсилатеральної і контралатеральної півкулі, зміни нервових волокон і міжнейрональних контактів. За допомогою цих показників розраховано фармакологічну ефективність кортексину, церебралі і церебралізіну. Встановлено, що при введенні церебралу відбувається зниження нейродегенерації в обох півкулях мозку, кортексину в контралатеральній, а церебралізіну не мав достовірного терапевтичного ефекту. Інтраназальний спосіб має переваги в зручності і швидкості введення препарату в організм у порівнянні з парентеральними системами доставки препаратів.

Ключові слова: геморагічний інсульт, гострий період, структурні порушення, фармакотерапія.

УДК 616. 831-005. 1-005. 4-036

ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛИ ГЕМОРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Савосько С. И.

Резюме. Исследованы морфологические изменения головного мозга при экспериментальном геморрагическом инсульте. Определены показатели гибели кортикальных нейронов ипсилатерального и контралатерального полушария, изменения нервных волокон и межнейронных контактов. С помощью этих показателей рассчитано фармакологическую эффективность кортексина, церебрала и церебролизина. Установлено, что при введении церебрала происходит снижение нейродегенерации в обоих полушариях мозга, кортексина в контралатеральном, а церебролизин не оказал достоверного терапевтического эффекта. Интраназальный способ имеет преимущества в удобности и скорости введения препарата в организм в сравнении с парентеральными системами доставки препаратов.

Ключевые слова: геморрагический инсульт, острый период, структурные нарушения, фармакотерапия.

UDC 616. 831-005. 1-005. 4-036

Application Models for Hemorrhagic Stroke Performance Evaluation of Pharmacological Peptide Drugs

Savosko S. I.

Summary. Treatment of stroke is actual problems of modern medicine. Studies of new drugs are conducted on various models of cerebrovascular disease and animals. Morphological data are calculated using modern methods of morphometry and statistics. At the same time there is a significant difference between the experimental models of stroke and interpretation of research results, the especially in studies of drugs effectiveness.

In experimental medicine, pharmacology and physiology developed various models of acute hemorrhagic stroke. Most studies have focused on the study of ischemic stroke types in various brain structures, while hemorrhagic stroke is devoted only a few models, although the mortality and severity of this pathology are significantly higher.

Previously developed method of local hemorrhage (acute autohemorrhagic stroke) is widely used by various experts in pharmacology and pathophysiology and is included in the list of methods for pre-clinical studies of drugs. In this paper, we improved model of hemorrhagic stroke, because modeling of hemorrhage in intact animals is not appropriate to consider, due to the fact that the disease develops in the presence of hypertension, cerebral vascular disease, or hemorrhagic transformation of ischemic stroke. The basic requirement for the model was as close to the pathogenesis of hemorrhagic stroke, which develops against chronic ischemic brain damage.

The model of locally recurrent stroke reproduced in 40 rats (mean weight of 205,3±6,6 g). The first phase of modeling included the implementation of occlusion of the right common carotid artery (a. carotis communis dextra). Ligation and occlusion of the common carotid artery was performed at the level of 18-20 mm before its bifurcation. After 10 days we simulated post-traumatic intracerebral hematoma. Local hemorrhage achieved by mechanical destruction of the tissues of the internal capsule (C. I. dextra, L = 3,5-4,0; H = 6,0; AP = 0,6-1,0) within previously engaged right hemisphere of the brain, and the mechanism of pathogenesis responsible development after transient ischemic attack (TIA) completed stroke. In the area of internal capsule by stereotaxis introduced mandren-knife to the local destruction of brain tissue (4-6 turns of curved mandren-knife) and blood vessels. In rat brain after experimental modeling of locally recurrent stroke in the internal capsule we observed destruction of brain tissue and bleeding in this area with damaged blood vessels.

We studied the effectiveness of peptide drugs: cerebrolysin (100 mg/kg) cortexin (2.5 mg/kg), cerebral (0.1 mg/kg). Drugs were administered to animals for 10 days after modeling recurrent stroke. After 10 days of modeling local acute hemorrhagic stroke performed histological and electron microscope study.

We found that the cerebral cortex pericellular and perivascular edema resulting in systemic edema of the brain, cortical degeneration of nerve fibers and loss of 13-15% of neurons in the cerebral cortex. Histological and morphometric studies have shown that the course introduction of cortexin and cerebral prevents degradation of synapses against neurodegeneration and brain edema in experimental stroke. Application of cerebrolysin not significantly affects the recovery processes at hemorrhagic stroke. Peptide drugs for acute cerebrovascular accident are not always effective and causing the development of neurological deficits. The main factor of poor medication is destructive changes of the cerebral cortex against neuronal swelling and degeneration.

Рецензент – проф. Шепітько В. І.

Стаття надійшла 10. 04. 2013 р.