

На правах рукописи



ХЛЁСТКИНА
МАРИЯ СЕРГЕЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ
ЦИТИКОЛИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Улан-Удэ – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей и экспериментальной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Суфианова Галина Зиновьевна – доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Верлан Надежда Вадимовна – доктор медицинских наук, профессор, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования - филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ / кафедры геронтологии, гериатрии и клинической фармакологии, профессор

Архипова Эржена Владимировна – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова» Министерства науки и высшего образования РФ / медицинский институт, кафедра терапии, старший преподаватель

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

Защита диссертации состоится «10» декабря 2019 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 999.140.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по адресу: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Бурятского научного центра СО РАН и на сайте ИОЭБ СО РАН: <http://igeb.ru>

Автореферат разослан «08» октября 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук, доцент



В.Б. Хобракова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Инсульт является второй ведущей причиной инвалидизации больных и смертности во всем мире (Котов С.В. и соавт., 2013; Санду Е.А. и соавт., 2016; Фирсов К.В. и соавт. 2019; Antonenko K. et al., 2016; O'Donnell M.J. et al., 2016; Thrift A.G. et al., 2017) и основной причиной заболеваемости населения, особенно в трудоспособном возрасте. Актуальность исследований, посвященных разработке и применению лекарственных средств для профилактики и лечения первичных и вторичных ишемических повреждений центральной нервной системы, обусловлена их высокой частотой, включая нарушения при нейрохирургических и кардиохирургических оперативных вмешательствах, снижающих реабилитационный потенциал и ухудшающих прогноз пациентов (Суфианова Г.З., 2003, 2014; Ricarte I.F. et al., 2015; Badenes R. et al., 2015; Kashkoush A.I. et al., 2017; Gopalakrishnan M.S. et al., 2018; Hood R. et al., 2018; Raffa G.M. et al., 2019).

Степень разработанности темы исследования

Исследования последних десятилетий показывают, что только изучение ишемических метаболических каскадов может определить дальнейшее направление патогенетической терапии церебрального ишемического инсульта (Домашенко М.А. и соавт., 2014; Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014; Tang K.S., Tan J.S., 2019; Albrecht M. et al., 2019). Таргетным действием на ключевые звенья повреждения нервной ткани различного генеза обладает препарат из группы нейропротекторов - цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин, ЦДФ-холин) — естественный эндогенный мононуклеотид, идентичный фосфатидилхолину и состоящий из холина, пирофосфата и цитидина (Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016). Ранее было продемонстрировано, что лечение цитиколином в постиншемическом периоде приводит к функциональному и морфологическому восстановлению клеток мозга за счет его влияния на синтез фосфолипидов и участия холина в нейрохимических процессах (Plataras C. et al., 2000; Li Z., Vance D.E., 2006; Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016). В других работах обсуждается возможное профилактическое действие данного препарата (Tornos M.E. et al., 1983; Krupinski J. et al., 2002; Hurtado O. et al., 2005; Giralt D. et al., 2010). До настоящего времени не проводилось сравнительных исследований защитного действия цитиколина при ишемии головного мозга на фоне его профилактического и лечебного применения. Не изучено влияние цитиколина на динамику развития ишемической деполяризации, одного из ключевых звеньев повреждения нервной ткани (Lauritzen M., Strong A.J., 2017). Остаются неизвестными потенциальные рецепторные механизмы

действия цитиколина, так как его защитный эффект нельзя однозначно объяснить влиянием на биосинтез фосфолипидов (Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016; El Sayed I., 2018). Особенностью фармакокинетики цитиколина является то, что при его экзогенном поступлении он под действием цитидиндезаминазы в плазме достаточно быстро метаболизируется до уридина (Cansev M., 2006; Dobolyi A. et al., 2011; Löffler M. et al., 2018), поэтому можно предположить, что часть его эффектов связана с повышением в головном мозге концентрации уридина и стимуляцией специфических пиримидиновых рецепторов, в частности P2Y6 (Dobolyi A. et al., 2011; Kouyuncuoglu T. et al., 2015; Rafahi M., Müller C.E., 2018; Löffler M. et al., 2018).

Цель исследования – выявить особенности нейропротективного действия цитиколина при глобальной и фокальной ишемии головного мозга у лабораторных животных и определить потенциальные рецепторные механизмы действия данного препарата.

Задачи исследования

1. Оценить нейропротективное действие цитиколина по изменению неврологического статуса, концентрации нейроспецифических белков в сыворотке крови и гистопатологическим нарушениям при транзиторной фокальной ишемии головного мозга у белых крыс.
2. Изучить нейропротективное действие цитиколина при введении в разные временные интервалы до моделирования глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у белых мышей по данным регистрации спонтанной биоэлектрической активности головного мозга и продолжительности гаспинга.
3. Исследовать влияние селективного антагониста P2Y6 рецепторов MRS2578 на продолжительность гаспинга, изменения локального мозгового кровотока и электрофизиологические нарушения при моделировании глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у белых мышей.
4. Выявить потенциальную роль P2Y6 рецепторов в механизмах нейропротективного действия цитиколина.

Научная новизна работы

На модели фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс показано, что превентивное введение цитиколина экспериментальным животным в дозе 2000 мг/кг за 60 минут до воспроизведения ишемии, в сравнение с его ежедневным введением после ишемии, приводит к меньшим неврологическим нарушениям, предотвращает повышение концентрации нейроспецифических белков NSE и S100b в плазме крови и предупреждает

развитие органических изменений в головном мозге у лабораторных животных.

На модели глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей впервые показано, что одномоментная регистрация уровня постоянного потенциала и электроэнцефалограммы, отражающих динамические процессы ишемической деполяризации, позволяет объективизировать повреждение нервной ткани путем определения скорости альтерации спонтанной биоэлектрической активности (максимальная депрессия суммарной амплитуды ЭЭГ и негативизация УПП), а также времени появления и окончания гаспинга по дыхательным артефактам; установлена прямая связь между выраженностью электрофизиологических нарушений и продолжительностью гаспинга у мышей. Установлено, что введение цитиколина в экспериментальной эффективной дозе 2000 мг/кг за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей сопровождается удлинением продолжительности гаспинга и времени развития максимальных электрофизиологических нарушений. Введение цитиколина в указанной дозе за 30 минут до воспроизведения ишемии не сопровождается значимыми проявлениями его нейропротективного действия.

Впервые в эксперименте, на модели глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей установлено, что выраженное нейропротективное влияние цитиколина за 60 минут до ишемии блокируется селективным антагонистом пиримидиновых рецепторов MRS2578, что предполагает роль P2Y₆ рецепторов как потенциальную мишень ведущего фармакологического эффекта цитиколина. При этом показано отсутствие значимого влияния селективного антагониста P2Y₆ рецепторов MRS2578 на продолжительность гаспинга и динамику спонтанной биоэлектрической активности головного мозга.

Указанные особенности в нейропротективном действии цитиколина имеют важное значение для клинической медицины.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе выполнения диссертационного исследования были разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение научной проблемы, имеющей важное значение для развития фармакологии, клинической фармакологии. По-новому оценено значение цитиколина как перспективного профилактического препарата при ишемии головного мозга. Обосновано продолжение целенаправленного поиска рецепторных мишеней нейропротективной активности данного препарата.

Разработана и предложена новая малотравматичная модель фокальной транзиторной ишемии головного мозга, которая позволяет проводить изучение нейропротективных свойств лекарственных препаратов. Способ

воспроизведения фокальной ишемии головного мозга защищен патентом РФ: RU2639787C1.

Методология и методы исследования

Исследования проведены в период с 2015 по 2019 г. Эксперименты выполняли на 51 здоровых беспородных крысах-самцах, массой 220-250 г. и 83 белых беспородных мышках-самцах, массой 20-25 г. Для оценки нейропротективного действия цитиколина при фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс использовали неврологические шкалы, определяли концентрацию нейроспецифических белков плазмы крови (NSE, S100 β) и гистопатологические изменения; на модели глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей оценивали продолжительность гаппинга, регистрировали спонтанную биоэлектрическую активность (УПП и ЭЭГ) и локальный мозговой кровоток. Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН. Дизайн исследования согласуется с приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 N 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Моделирование ишемии головного мозга, вживление электродов, а также другие инвазивные процедуры проводили под адекватным обезболиванием (золетил-100, 7,5 мг/кг, внутривенно). Цитиколин (2000 мг/кг - экспериментальная эффективная доза) во всех экспериментальных группах вводили внутривенно. Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных специалистов по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту

1. Цитиколин обладает выраженным нейропротективным действием при профилактическом введении животным при фокальной и глобальной ишемии головного мозга.
2. Выраженный нейропротективный эффект цитиколина проявляется при его введении за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей.
3. Пиримидиновые P2Y₆ рецепторы являются потенциальной мишенью нейропротективного эффекта цитиколина.

Внедрение результатов исследования в практику

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедре нейрохирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедре фармакологии, клинической фармакологии и фитотерапии медицинского института ФГБОУ ВО

«Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова», в работе ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН и внедрены в лечебную работу ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментального материала, однородностью выборки субъектов, применением современных методов исследования и адекватных методов биомедицинской статистики, теоретическим обоснованием полученных данных. Материалы и основные положения диссертации представлялись на конгрессе «Человек и лекарство. УРАЛ-2016» (г. Тюмень, 2016), XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2017), на конкурсе молодых ученых по специальности «Клиническая фармакология» в рамках съезда молодых терапевтов XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (г. Москва, 2017 г.), региональной научно-практической конференции молодых инноваторов «Новые векторы развития науки и техники в Тюменской области» в формате всероссийского конкурса инноваций «УМНИК» (г. Тюмень, 2017, 2018), V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (г. Ярославль, 2018), XIII национальном конгрессе терапевтов (г. Москва, 2018), XXV российском национальном конгрессе «Человек и Лекарство» (г. Москва, 2018). Общероссийском научно-практическом мероприятии «Эстафета вузовской науки» (диплом II степени, г. Москва, 2019).

Личное участие автора

Автором проведена самостоятельная работа с источниками отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, обобщение данных, оформление в виде обзора литературы, освоение методик и выполнение экспериментов на животных, в частности, моделирование ишемии головного мозга у крыс и мышей, регистрация и анализ электрофизиологических параметров у экспериментальных животных, проведение биохимических анализов, а также морфологическое исследование головного мозга животных в соответствии с дизайном исследований. Автором осуществлялось: формирование базы данных, статистическая обработка полученного материала, написание и публикация статей, участие в научно-практических конференциях и конгрессах.

Публикации

По материалам выполненных исследований опубликовано 15 работ, в том числе 4 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки

РФ для опубликования основных результатов диссертации. Получен патент на изобретение (RU2639787C1, от 22.12.2017 Бюл. № 36).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты фармакологических исследований, заключение, выводы и список литературы. Работа иллюстрирована 34 рисунками и 8 таблицами. Список литературы содержит 224 источника, из них 22 отечественных и 202 - на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика экспериментальных исследований

Работа выполнена на 51 беспородных крысах-самцах, массой 220-250 г. и 83 белых беспородных мышах-самцах, массой 20-25 гр. Опыты на животных осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР N 755 от 12.08.1977 г.). Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН. Дизайн исследования согласуется с приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 N 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Моделирование ишемии головного мозга, вживление электродов, а также другие инвазивные процедуры животным проводили под адекватным обезболиванием (золетил-100, 7,5 мг/кг, внутривенно).

Проводили 2 серии экспериментов. Первая серия опытов была проведена на 51 крысе. Все экспериментальные животные этой серии были разделены на 4 основных группы. Первая, ложнооперированная группа (n=8) была представлена крысами, у которых осуществляли оперативный доступ к брахицефальным артериям без последующего моделирования ишемии головного мозга. Вторая, контрольная группа (N=17) была представлена животными, у которых осуществляли моделирование фокальной транзиторной 60 минутной ишемии головного мозга по разработанной нами методике. В третью (N=14) группу были включены крысы, у которых осуществляли моделирование 60 минутной транзиторной ишемии головного мозга с последующим постреперфузионным (сразу после ишемии) и ежедневным внутривенным введением цитиколина (2000 мг/кг). В четвертой группе крыс (вторая экспериментальная группа, N=12) моделировали ишемию головного мозга по предложенной методике на фоне предварительного, за 60 минут до окклюзии левой СМА, внутривенного введения 2000 мг/кг цитиколина. Вторая серия экспериментов была выполнена на 83 мышах-самцах. Все животные этой серии были разделены

на 5 основных групп. В первой (контрольной) группе (N=20) исследовали продолжительность газпинга и электрофизиологические проявления глобальной ишемии головного мозга. Во второй экспериментальной группе (N=15) за 30 минут до моделирования глобальной ишемии головного мозга внутрибрюшинно вводили раствор цитиколина (цитидин-5-дифосфохолин, ЦДФ-холин, 2000 мг/кг). В третьей экспериментальной группе (N=14) раствор цитиколина вводили за 60 минут до моделирования глобальной ишемии. Четвертая экспериментальная группа (N=18) была представлена мышами, которым за 90 минут до моделирования ишемии внутрибрюшинно вводили раствор селективного антагониста пиримидиновых P2Y₆ рецепторов MRS2578 (25 мкг/кг). В пятой группе (N=16) лабораторным животным за 90 минут до моделирования ишемии внутрибрюшинно вводили раствор MRS2578 (25 мкг/кг) с последующим, за 60 минут до ишемии, внутрибрюшинным введением цитиколина (2000 мг/кг).

Во всех сериях экспериментов в качестве основного исследуемого нейропротективного препарата использовался цитиколин («Цераксон», Феррер Интернасьональ, С.А., Испания). В качестве селективного антагониста P2Y₆ рецепторов применялось вещество MRS2578 (Tocris Bioscience, UK), которое предварительно растворяли в 0,1% растворе диметилсульфоксида.

Во первой серии экспериментов моделировали транзиторную фокальную ишемию головного мозга у крыс путем 60 минутной окклюзии левой СМА по разработанной нами методике (патент на изобретение RU2639787C1). Для оценки нейропротективного действия цитиколина в этой серии оценивали неврологические нарушения, определяли концентрацию нейроспецифических белков в плазме крови (NSE, S100 β) и изучали гистопатологические изменения в головном мозге. Оценку выраженности неврологических нарушений у крыс в первой серии экспериментов осуществляли до - и ежедневно в последующие 5 суток после моделирования повреждения с применением известных неврологических тестов: 4х бальной шкалы Бедерсона (0 – норма, 1 – умеренное расстройство, 2 – выраженное расстройство, 3 – грубые нарушения, хождение по кругу) и шкалы оценки неврологических нарушений McGraw с модификациями Ohno K. (Ohno K. et al., 1984; McGraw С.Р., 1977). Для оценки «сенсомоторной» асимметрии и наличия пареза зора у крыс выполняли угловой тест (corner test) (Бонь Е.И., Максимович Н.Е., 2014). С целью определения концентрации нейроспецифических белков (NSE и S-100b), производили исследование образцов плазмы венозной крови до- и на 1, 3 и 5 сутки после моделирования ишемии головного мозга. Содержание NSE и S-100b определяли на анализаторе Elecsys 1010 (Швейцария). Концентрацию нейроспецифической енолазы (NSE) в плазме крови выражали в мкг/мл, концентрацию белка S100 β в нг/мл. Оценку степени гистопатологических изменений производили

по 4х бальной гистопатологической шкале (0-без признаков повреждения; 1-отдельные повреждения нервных клеток; 2-повреждение более 50% нервных клеток; 3-тотальное повреждение) после гибели животного или при выведении его из эксперимента на 5 сутки после моделирования ишемии. Суммарный гистопатологический балл подсчитывали как сумму баллов изменений в гиппокампе, соматосенсомоторной коре головного мозга и базальных ганглиях.

Во второй серии экспериментов, с целью моделирования тотальной ишемии головного мозга у мышей, использовали модификацию модели странгуляционной ишемии (Суфианова Г.З., 1994; Кулинский В.И. и соавт., 1996; Волчегорский И.А. и соавт., 2014) с применением специальной пластиковой стяжки. Исследование устойчивости головного мозга к глобальной ишемии и изучение нейропротективного влияния цитиколина у экспериментальных животных данной серии проводили путем использования количественных показателей – продолжительности гаспинга, регистрации спонтанной биоэлектрической активности головного мозга (БЭА ГМ) и локального мозгового кровотока. Запись БЭА ГМ осуществляли путем одновременной регистрации электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и уровня постоянного потенциала (УПП), отражающего изменения поляризационных процессов в нервной ткани, с использованием 24 битного АЦП на основе микросхемы ADS1298 (Texas Instruments, USA). Количественное изучение объемного мозгового кровотока выполняли транскраниально через трепанационные отверстия в проекции теменных долей головного мозга мышей с использованием 2х датчиков диаметром 1 мм и компьютеризованного доплерометра BLF 21CD (Transonic System Inc. USA).

Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Office 365) и Matlab 7.14 (MathWorks, Inc). Совокупные частоты и показатели выживания оценивали с помощью метода Каплана-Мейера. Категорийные данные были представлены частотами и процентами. Для количественных и альтернативных признаков рассчитывали среднее и стандартную ошибку средней. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали параметрический критерий t — Стьюдента и непараметрический критерий U — Уилкоксона-Манна-Уитни. Связь между параметрами оценивали с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакологическая оценка профилактического и лечебного действия цитиколина при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга

При моделировании фокальной ишемии головного мозга у крыс контрольной группы средний балл по шкалам Бедерсона и McGraw за 5 суток наблюдения составили соответственно $2,5 \pm 0,1$ и $9,3 \pm 0,7$ (рис. 1). Игнорирование левой половины пространства и повороты в здоровую сторону при проведении углового теста (Corner test) в исследуемой группе наблюдали в среднем в $7,3 \pm 0,2$ попытках из 10 у каждой крысы. Общая летальность экспериментальных животных контрольной группы составила $58,8 \pm 12,7\%$, средняя продолжительность жизни – $3,6 \pm 0,5$ суток. Корреляция летальности с суммарными неврологическими нарушениями, выявляемыми по шкалам Бедерсона, McGraw и с использованием углового теста составила $0,57$ ($P < 0,05$), $0,65$ ($P < 0,05$) и $0,49$ ($P < 0,05$).

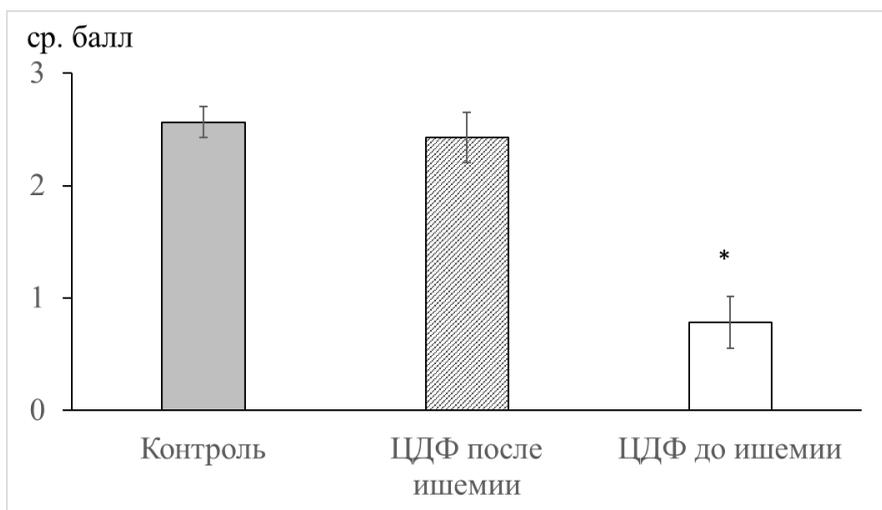


Рис. 1. Средний неврологический балл (шкала Бедерсона) в течение первых 5 суток наблюдения при моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у крыс: «Контроль» - контрольная группа (моделирование ишемии головного мозга); «ЦДФ после ишемии» - первая экспериментальная группа (моделирование ишемии головного мозга с последующим ежедневным лечебным внутрибрюшинным введением цитиколина); «ЦДФ до ишемии» - вторая экспериментальная группа (моделирование ишемии головного мозга на фоне профилактического внутрибрюшинного введения цитиколина).

* – $P < 0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами.

У крыс первой экспериментальной группы на фоне лечебного ежедневного внутривентрикулярного введения цитиколина, несмотря на некоторую тенденцию к более низким значениям показателей, существенных отличий неврологических проявлений и общей летальности экспериментальных животных от контрольной группы не наблюдали. Средний неврологический балл с использованием шкал Бедерсона и McGraw у крыс данной группы в первые 5 суток эксперимента составил соответственно $2,4 \pm 0,2$ и $8,8 \pm 0,9$ (рис. 1). Игнорирование левой половины пространства (неглект) и число поворотов в правую сторону при проведении углового теста в исследуемой группе наблюдали в среднем в $7,2 \pm 0,5$ попытках из 10 ($P < 0,01$ в сравнении с исходным, дооперационным уровнем). Общая летальность крыс первой группы составила $42,9 \pm 0,1\%$, средняя продолжительность жизни на $8,3\%$ превышала аналогичные значения в контрольной группе и составила $3,9 \pm 0,4$ дня.

Наиболее существенное защитное действие цитиколина, по данным неврологического тестирования отмечалось при его введении за 60 минут до моделирования ишемии головного мозга у крыс второй экспериментальной группы. Средний неврологический балл с использованием шкал Бедерсона и McGraw у животных данной группы за 5 суток наблюдения составил соответственно $0,8 \pm 0,2$ и $2,1 \pm 0,8$ ($P < 0,01$ в сравнении с данными контрольной и первой экспериментальной групп) (рис. 3). Неглект левой половины пространства при проведении углового теста наблюдали в среднем в $5,8 \pm 0,4$ попытках из 10, что статистически не отличалось от исходного уровня. В данной группе наблюдали минимальную летальность – за все время эксперимента погибло 2 из 12 крыс на 2 и 3 сутки наблюдения, общая летальность составила $16,7 \pm 11,7\%$ ($P < 0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами), средняя продолжительность жизни $4,6 \pm 0,3$ дня ($P < 0,05$).

Гистопатологические нарушения при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс на фоне введения цитиколина

Наиболее выраженные гистопатологические нарушения выявлялись у крыс контрольной группы. Суммарный гистопатологический балл у животных данной группы составлял $6,3 \pm 0,9$ (рис. 2). Гистопатологические изменения коррелировали с выраженностью неврологического дефицита. Наиболее высокая положительная корреляция была выявлена с показателями теста Бедерсона и шкалы McGraw, соответственно $0,78$ ($P < 0,05$) и $0,76$ ($P < 0,05$). Корреляция с показателями углового теста составила $0,62$ ($P < 0,05$). Значимой корреляции с постишемической летальностью и продолжительностью жизни животных выявлено не было.

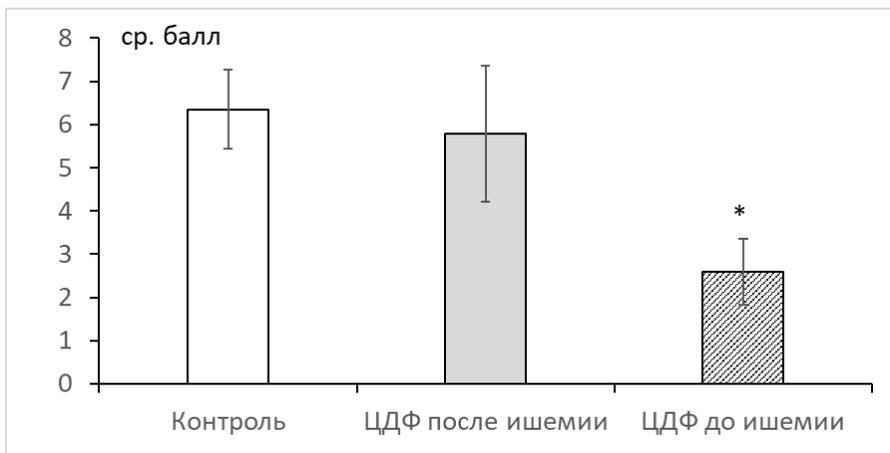


Рис. 2. Суммарная оценка повреждения в различных отделах головного мозга у крыс при моделировании транзиторной 60 минутной фокальной ишемии головного мозга. * – $P < 0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами.

У крыс первой экспериментальной группы при ежедневном внутривенном введении цитиколина в постинишемическом периоде отмечали статистически не значимую тенденцию к умеренному снижению степени органического повреждения нервной ткани. Суммарный гистопатологический балл у крыс данной группы составил $5,7 \pm 1,6$.

У крыс второй экспериментальной группы, при профилактическом применении цитиколина до моделирования ишемии головного мозга степень гистопатологических нарушений была существенно меньше, чем в других группах (рис. 2). Суммарный гистопатологический балл у крыс данной группы был примерно в 2,4 раза меньше, чем в контрольной серии и составил $2,6 \pm 0,8$ ($P < 0,01$).

Концентрация нейроспецифических белков NSE и S100b в плазме крови при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс на фоне введения цитиколина

У всех животных контрольной группы в первые сутки отмечали значительное возрастание уровня нейроспецифической енолазы (NSE) на $232,2 \pm 8,1\%$ от исходного уровня ($P < 0,01$ в сравнении с до-инишемическим уровнем) с последующей тенденцией к незначительному снижению до $194,5 \pm 10,4\%$ от исходного уровня ($P < 0,01$ в сравнении с исходным до-инишемическим уровнем и 1 сутками после моделирования ишемии) (рис. 3а).

Повышение концентрации белка S100b в плазме крови в данной группе было более существенным и составило $308,9 \pm 8,6\%$ от исходного значения ($P < 0,01$ в сравнении с исходным до-ишемическим уровнем) (рис. 3б). На 3 и 5 сутки также отмечалась тенденция к постепенному снижению сывороточной концентрации данного белка, содержание которого к 5 суткам составило $270,1 \pm 13,2\%$ от исходного уровня ($P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем, $P < 0,05$ в сравнении с 1 сутками после моделирования ишемии). Статистической разницы между изменениями этого показателя на 1 и 3 сутки не наблюдали.

У крыс первой основной экспериментальной подгруппы, на фоне ежедневного внутрибрюшинного введения цитиколина, статистической разницы в динамике изменений концентраций нейроспецифических белков в первые 5 суток постишемического периода в сравнении с контрольной группой выявлено не было. Концентрация NSE у животных данной серии, аналогично контрольной группе, в первые сутки после ишемии увеличилась до $228,9 \pm 6,6\%$ от исходного уровня ($P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем) с постепенным статистически значимым снижением до $188,2 \pm 7,5\%$ от исходного уровня к 5 суткам после ишемии ($P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем, $P < 0,05$ в сравнении с 1 сутками после моделирования ишемии). Увеличение сывороточной концентрации S100b в этой группе составило в 1 сутки $306,7 \pm 13,9\%$ от исходного уровня ($P < 0,01$). К 5 суткам концентрация этого белка снизилась до $260,2 \pm 13,4\%$ от исходного уровня ($P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем, $P < 0,05$ в сравнении с 1 сутками после моделирования ишемии).

Динамика изменений концентрации NSE у крыс второй экспериментальной подгруппы (моделирование ишемии головного мозга на фоне профилактического введения цитиколина) характеризовалась максимальным уровнем только на 3 сутки после окклюзии левой СМА, когда концентрация этого белка превысила исходное доишемическое значение на $93,4 \pm 5,6\%$ ($P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем и 1 сутками после моделирования ишемии; $P < 0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами). На 5 сутки наблюдали статистически значимое снижение концентрации данного белка в сыворотке крови до $147,9 \pm 4,0\%$ ($P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем и 3 сутками после моделирования ишемии; $P < 0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами) (рис. 3а). Динамика изменений концентрации белка S100b была подобна изменениям в контрольной группе с максимальным уровнем на 1 сутки после моделирования ишемии головного мозга (рис. 3б).

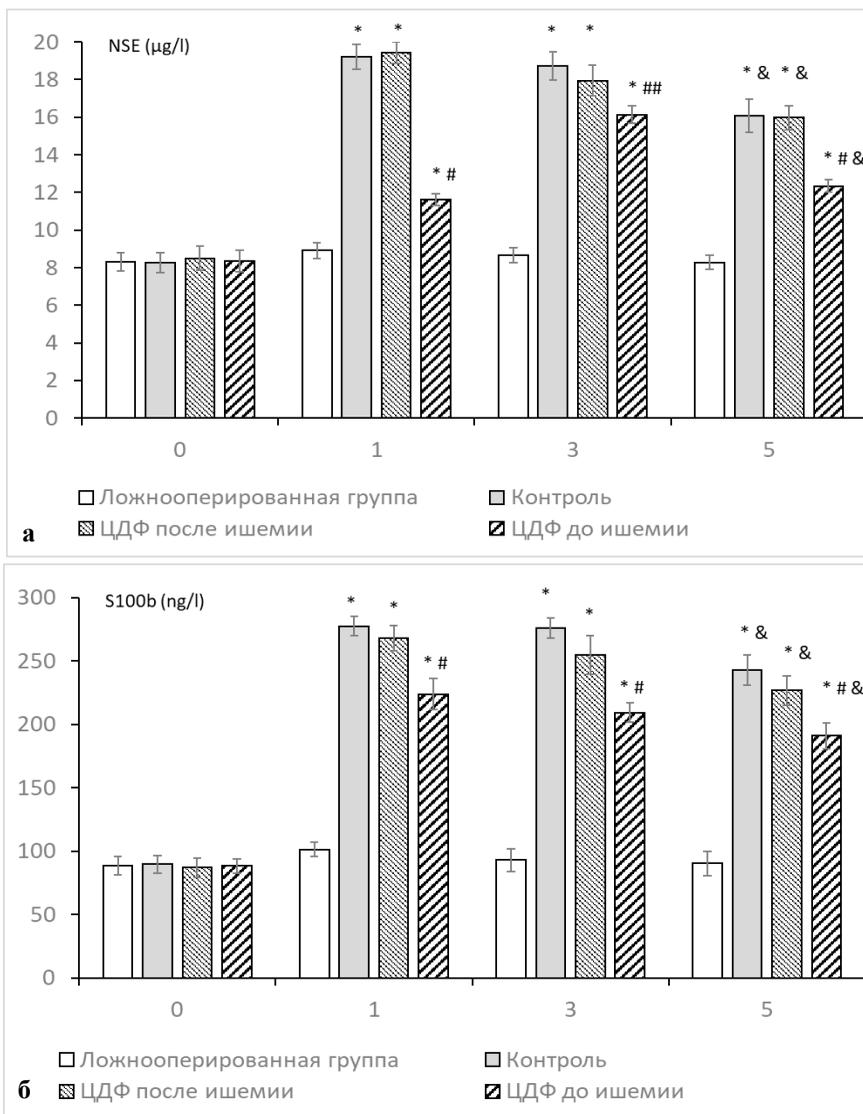


Рис.3. Концентрация NSE (мкг/л) (а) S100b (нг/л) (б) в плазме крови при моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у крыс: * - $P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем; # - $P < 0,01$, ## - $P < 0,05$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами; & - $P < 0,05$ в сравнении с максимальным уровнем концентрации.

Концентрации этого белка в плазме крови в первые сутки в данной подгруппе составила $253,4 \pm 13,9\%$ ($P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем, $P < 0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами). На 5 сутки отмечалось снижение концентрации S100b до $216,0 \pm 11,3\%$ от исходного уровня ($P < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем, $P < 0,01$ в сравнении с контрольной и первой экспериментальной группами).

Исследование нейропротективного действия цитиколина при моделировании глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей

Моделирование глобальной странгуляционной ишемии головного мозга сопровождалось быстрым, в течение 0,64 секунд, снижением локального мозгового кровотока у мышей до $6,2 \pm 0,2\%$ от исходного уровня, что объясняется острым нарушением кровообращения по брахицефальным артериям. Аналогичная степень и скорость угнетения мозгового кровотока отмечалась во всех исследуемых группах. Снижение кровотока также сопровождалось выраженной депрессией суммарной амплитуды ЭЭГ и негативными сдвигами УПП. В момент прекращения агональных дыхательных движений у большинства мышей наблюдалось появление в записи ЭЭГ характерного артефакта в виде однофазной или двухфазной волны продолжительностью до 1-2 секунды и амплитудой от 100 мкВ до 1 мВ (рис. 4).

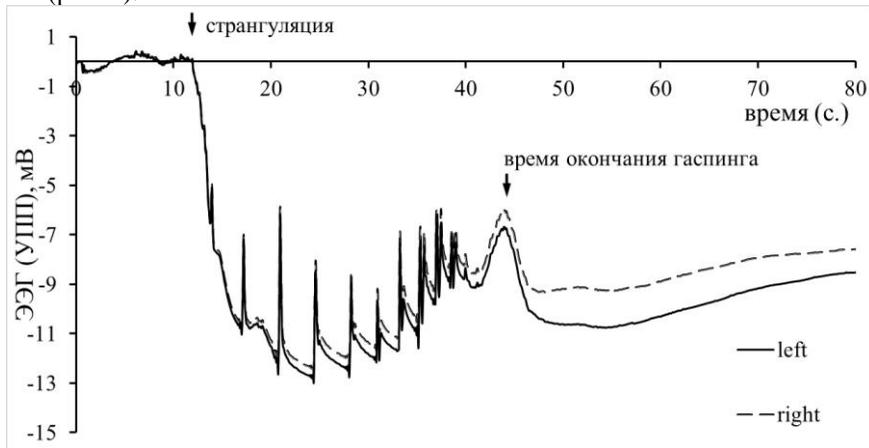


Рис.4. Пример записи ЭЭГ мыши с теменных отведений при моделировании глобальной странгуляционной ишемии головного мозга. Стрелкой указан момент начала ишемии (странгуляция) и окончания гаспинга. Видно появление в записи ЭЭГ характерного артефакта в виде однофазной волны при прекращении агонального дыхания.

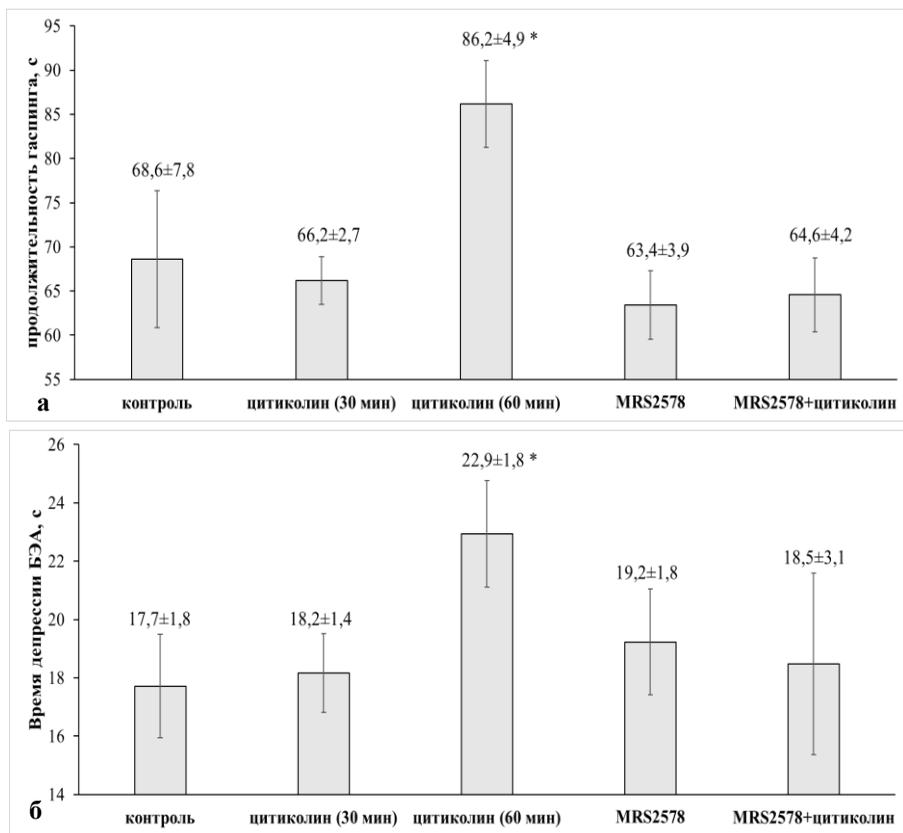


Рис.5. Продолжительность гаспинга (а) и среднее время полного угнетения спонтанной биоэлектрической активности головного мозга (б) в различных экспериментальных группах при моделировании глобальной странгуляционной ишемии головного мозга: * - $P < 0,05$ в сравнении с другими группами.

При моделировании ишемии у мышей контрольной группы в среднем через $19,7 \pm 2,1$ секунд с момента странгуляции наблюдалось развитие агонального дыхания (гаспинга), средняя продолжительность которого составляла $68,6 \pm 7,8$ секунд от начала ишемии (рис. 2а). Максимальная амплитуда электроотрицательных сдвигов постоянного потенциала (до $14,2 \pm 0,4$ мВ) и практически полное угнетение суммарной амплитуды ЭЭГ в данной группе животных регистрировали в среднем через $17,7 \pm 1,8$ секунд после начала ишемии (рис. 5). Была выявлена средняя корреляция между

временем тотальной депрессии электрофизиологических параметров и продолжительностью гаспинга ($r=0,57$, $P<0,05$).

Профилактическое введение цитиколина за 30 минут до моделирования глобальной ишемии головного мозга у мышей второй экспериментальной группы не сопровождалось значимыми изменениями продолжительности гаспинга и электрофизиологическими сдвигами.

Развитие терминального дыхания у мышей этой группы наблюдалось в среднем через $18,3\pm 1,1$ секунд и соответствовало времени максимального угнетения электрофизиологических параметров - $18,2\pm 1,4$ секунд (рис 2б), средняя продолжительность гаспинга была $66,2\pm 2,7$ секунд (рис. 2а). Наблюдаемые временные интервалы статистически не отличались от аналогичных в контрольной группе. Максимальная степень негативизации УПП в анализируемой группе регистрировалась через 15-20 секунд с момента странгуляции и составляла $14,8\pm 0,5$ мВ.

В третьей группе мышей, с профилактическим внутривенным введением 2000 мг/кг цитиколина за 60 минут до начала ишемии, объективно, в сравнении с другими группами, наблюдали более продолжительный период агонального дыхания до $86,2\pm 4,9$ секунд ($P<0,05$ в сравнении с контрольной группой, $P<0,01$ в сравнении со второй группой) (рис. 5а). Тотальное угнетение электрофизиологических параметров в виде максимальной негативизации УПП (до $13,0\pm 0,4$ мВ) и депрессии амплитуды ЭЭГ до 10-20% от исходного уровня регистрировали в среднем через $22,9\pm 1,8$ секунд после начала странгуляции (рис. 5б), что было значимо больше, чем в других группах ($P<0,05$).

В четвертой экспериментальной группе, при введении селективного антагониста MRS2578 за 90 минут до ишемии, продолжительность агонального дыхания имела тенденцию к снижению до $63,4\pm 3,8$ секунд (рис. 5а), однако статистических различий по этому параметру от контрольной группы не отмечалось. Среднее время максимальных электроотрицательных сдвигов УПП ($14,4\pm 0,36$ мкВ), несмотря на некоторую тенденцию к уменьшению, также соответствовало контрольной группе – $17,2\pm 2,6$ секунд (рис. 5б).

Введение цитиколина через 30 минут после инъекции антагониста MRS2578 и за 60 минут до начала ишемии в 5 экспериментальной группе не сопровождалось удлинением продолжительности терминального дыхания и времени полной деполяризации. Средняя продолжительность гаспинга в этой группе составила $64,6\pm 4,2$ секунд (рис. 5а). Максимальная амплитуда деполяризации до $14,4\pm 0,5$ мВ регистрировалась в среднем через $18,5\pm 3,1$ секунд от начала ишемии (рис. 5б). Электрофизиологические и другие корреляты ишемии головного мозга у мышей данной группы соответствовали аналогичным изменениям в контрольной, второй и 4 экспериментальных группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемия головного мозга представляет собой сложный динамический и потенциально обратимый процесс, включающий совокупность гемодинамических и метаболических изменений, происходящих при недостаточности кровоснабжения головного мозга (Виленский Б.С., 2008) и приводящий к дисфункции и гибели нервных клеток (Гусев Е.И. и соавт., 2003; Суфианова Г.З., Шапкин А.Г., 2014). Таргетным воздействием на ключевые звенья процессов повреждения нервной ткани гипоксического, ишемического, травматического или другого генеза обладает препарат из группы нейропротекторов - цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин, ЦДФ-холин) — естественный эндогенный мононуклеотид, идентичный фосфатидилхолину и состоящий из холина, пиррофосфата и цитидина (Grieb P., 2014; Secades J.J., 2016; El Sayed I., 2018). В нашем исследовании мы провели сравнительную оценку нейропротективного действия цитиколина при профилактическом и лечебном введении в эксперименте на модели фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс. Как видно из полученных результатов, при назначении цитиколина в раннем постишемическом периоде практически не отмечается улучшение неврологических функций, изменения концентрации нейроспецифических белков и уменьшения органического повреждения нервной ткани в сравнении с контрольной группой. Более эффективным было введение цитиколина с профилактической целью. Несмотря на достаточно большое количество публикаций, посвященных оценке защитного действия данного препарата при церебральной ишемии, механизмы действия цитиколина рассматриваются преимущественно в рамках его влияния на синтез фосфолипидов в мембранах нейронов при лечебном, постишемическом назначении (Diederich K. et al., 2012; Grieb P., 2014). Однако, выраженное защитное действие этого препарата при однократном профилактическом назначении нельзя однозначно объяснить его влиянием на синтез фосфолипидов. Ключевой особенностью фармакокинетики цитиколина является то, что при его экзогенном поступлении, он под действием цитидин-деаминазы в плазме достаточно быстро метаболизируется до уридина, при этом экзогенные фракции цитидина и уридина максимально накапливаются в ткани головного мозга в химически свободной форме в среднем через 60 минут после парентерального введения (Страдомский Б.В., 1992; Secades J.J., 2016). Таким образом, можно предполагать, что нейропротективный эффект цитиколина может быть связан с активацией его метаболитами (в частности, уридином) специфических пиримидиновых P2Y рецепторов на мембранах нервных клеток (Cansev M. et al., 2013; Koyuncuoglu T. et al., 2015; von Kügelgen I., Hoffmann K., 2016). Для подтверждения этой гипотезы нами была проведена серия дополнительных экспериментов на модели глобальной

странгуляционной ишемии головного мозга у мышей. Было установлено, что введение цитиколина за 30 минут до ишемии не оказывает существенного защитного действия на продолжительность жизни мышей и изменения электрофизиологических параметров в сравнении с контрольной группой. Введение цитиколина за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии сопровождается удлинением общей положительности жизни мышей и замедлением развития полной ишемической деполяризации и альтернации ЭЭГ в сравнении с другими группами. В исследовании было установлено, что селективный антагонист P2Y₆ рецепторов MRS2578 полностью предупреждает нейропротективное действие цитиколина не влияя на процессы ишемической деполяризации и продолжительность жизни мышей контрольной группы, что предполагает роль пиримидиновых рецепторов как потенциальную мишень ведущего фармакологического эффекта ЦДФ-холина.

Дальнейшее изучение рецепторных механизмов фармакологических эффектов цитиколина является перспективным для понимания механизмов активности данного препарата в клинической практике, для предупреждения ишемических нарушений и лечения нейродегенеративных заболеваний (Weisman G.A. et al., 2012; Kügelgen I., Hoffmann K., 2016).

ВЫВОДЫ

1. Введение цитиколина при фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс в раннем постишемическом периоде не сопровождается значимыми изменениями неврологического статуса, концентрации нейроспецифических белков, летальности и выраженности гистопатологических нарушений в сравнении с группой контроля.
2. Профилактическое введение цитиколина, в сравнении с его лечебным действием, при моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у крыс сопровождается меньшей степенью неврологических нарушений, снижением летальности и уменьшением выраженности повреждения головного мозга.
3. Введение цитиколина за 60 минут до моделирования глобальной странгуляционной ишемии головного мозга у мышей, в отличие от его введения за 30 минут, сопровождается более выраженным удлинением общей продолжительности гаспинга и замедлением развития полной ишемической деполяризации.
4. Селективный антагонист пиримидиновых P2Y₆ рецепторов MRS2578 не влияет на процессы ишемической деполяризации и продолжительность гаспинга у животных на модели глобальной ишемии головного мозга.

5. MRS2578 полностью блокирует нейропротективное действие цитиколина, что предполагает роль P2Y6 рецепторов как потенциальную мишень ведущего фармакологического эффекта цитиколина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная модель транзиторной фокальной ишемии головного мозга может использоваться для изучения фармакологических эффектов лекарственных препаратов с потенциальными нейропротективными свойствами.
2. Регистрация УПП и ЭЭГ, отражающих динамику поляризационных процессов, может использоваться для верификации развития ишемической деполяризации нервной ткани в качестве объективного диагностического критерия, позволяющего проводить сравнительную оценку нейропротективных свойств лекарственных препаратов.
3. Целесообразно использование цитиколина с профилактической целью в клинической практике для предупреждения вторичных ишемических нарушений в раннем послеоперационном периоде.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Суфианова, Г.З. Изменения спонтанной электрической активности головного мозга в острый период моделирования фокального ишемического повреждения у крыс / Г.З. Суфианова, А.А. Суфианов, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина, Р.А. Суфианов // Конгресс «Человек и лекарство. УРАЛ – 2016»: сборник материалов. – Тюмень, 2016. – С. 90.
2. Суфианова, Г.З. Центральные электрофизиологические эффекты агонистов аденозиновых рецепторов в эксперименте / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, А.А. Суфианов, М.С. Хлёткина, С.В. Реунов, П.В. Масунов // Конгресс «Человек и лекарство. УРАЛ – 2016»: сборник материалов. – Тюмень, 2016. – С. 90-91.
3. Суфианова, Г.З. Новая экспериментальная модель фокальной ишемии головного мозга у крыс / Г.З. Суфианова, А.А. Суфианов, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина, Р.А. Суфианов // Конгресс «Человек и лекарство. УРАЛ – 2016»: сборник материалов. – Тюмень, 2016. – С. 89.
4. Суфианова, Г.З. Изменения уровня постоянного потенциала и электроэнцефалограммы при моделировании фокальной ишемии головного мозга у крыс / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, А.А. Суфианов, М.С. Хлёткина, Г.А. Аргунова // Материалы XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2017. – С. 174.

5. Суфианова, Г.З. Гистопатологические и неврологические нарушения у крыс при моделировании ишемии головного мозга путем внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, А.А. Суфианов, М.С. Хлёткина, Т.В. Ищенко // Материалы XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2017. – С. 174.
6. Пат. № 2639787С1 Российская Федерация МПК G09В 23/28. Способ моделирования фокальной ишемии головного мозга / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина, Р.В. Лутовинин, Н.В. Саукова, Е.М. Квитко, А.А. Суфианов; Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России. – № 2015156538; заявл. 28.12.2015, опубл. 22.12.2017, Бюл. № 36.
7. Хлёткина, М.С. Таргетное воздействие цитиколина на ключевые звенья процессов повреждения нервной ткани / М.С. Хлёткина, Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, А.А. Суфианов // Уральский медицинский журнал. – 2018. – №7. – С. 89-92.
8. Суфианова, Г.З. Нейропротекторная активность цитиколина при профилактическом введении в эксперименте / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина, А.А. Суфианов // Уральский медицинский журнал. – 2018. – №7. – С. 83-88.
9. Суфианова, Г.З. Сравнительная оценка профилактического и лечебного защитного эффектов цитидин 5'-дифосфохолина при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81 (приложение). – С. 235.
10. Суфианова, Г.З. Защитное действие цитидиндифосфохолина при моделировании тотальной ишемии головного мозга у мышей / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина, А.А. Суфианов, А.К. Тюлюбаев // Материалы XXV Российского национального конгресса «Человек и Лекарство». – М., 2018. – С. 127.
11. Суфианова, Г.З. Изменение концентрации нейроспецифических белков NSE и S100 β в плазме крови при моделировании фокальной ишемии головного мозга у крыс на фоне профилактического введения цитидиндифосфохолина / Г.З. Суфианова, А.Г. Шапкин, А.А. Суфианов, М.С. Хлёткина // Материалы XXV Российского национального конгресса «Человек и Лекарство». – М., 2018. – С. 127.
12. Шапкин, А.Г. Изменение латентности компонентов слуховых вызванных потенциалов и P300 у крыс при моделировании фокальной ишемии головного мозга на фоне профилактического введения цитидиндифосфохолина / А.Г. Шапкин, Г.З. Суфианова, А.А. Суфианов, М.С. Хлёткина // Материалы XXV Российского национального конгресса «Человек и Лекарство». – М., 2018. – С. 133-134.

13. Суфианова, Г.З. Влияние цитиколина на изменения концентрации нейроспецифических белков NSE и S100b в сыворотке крови при моделировании ишемии головного мозга у крыс / Г.З. Суфианова, А.А. Суфианов, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина // Материалы XIII Национального конгресса терапевтов. – М., 2018. – С. 131.
14. Суфианова, Г.З. Неврологическая оценка нейропротекторной активности цитиколина при моделировании ишемии головного мозга у крыс / Г.З. Суфианова, А.А. Суфианов, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина // Материалы XIII Национального конгресса терапевтов. – М., 2018. – С. 131.
15. Суфианова, Г.З. Профилактическое применение цитиколина эффективнее лечебного при моделировании транзиторной ишемии головного мозга у крыс / Г.З. Суфианова, А.А. Суфианов, А.Г. Шапкин, М.С. Хлёткина, А.М. Машкин, Р.А. Суфианов // «Сеченовский вестник». – 2019. – Т. 10, № 2. – С. 21-28.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЭА ГМ	–	биоэлектрическая активность головного мозга
СМА	–	средняя мозговая артерия
УПП	–	уровень постоянного потенциала
ЦДФ-холин	–	цитидин-5-дифосфохолин
ЭЭГ	–	электроэнцефалограмма
NSE	–	нейроспецифическая енолаза

Подписано в печать 08.10.2019 г. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Объем 1,4 печ.л. Тираж 100. Заказ №