

И.В. Барсков¹, Е.В. Стельмашук², Г.А. Романова¹, Л.Г. Хаспеков²

Морфологическое исследование нейропротекторных свойств дипептидного миметика фактора роста нервов (ГК-2h) при фокальном ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук, Москва, 125315, Балтийская ул., 8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

Исследовано нейропротекторное действие дипептида ГК-2h, миметика фактора роста нервов, при двусторонней фокальной фотоиндуцированной ишемии префронтальной коры головного мозга крыс. Установлено, что внутрибрюшинное введение ГК-2h в дозе 0,1 мг/кг через 1 или 4 ч, а затем на 2-е, 4-е и 8-е сут. после индукции фототромбоза достоверно препятствует увеличению объема ишемического очага.

Ключевые слова: миметик фактора роста нервов, префронтальная кора головного мозга крысы, фотоиндуцированный тромбоз, нейропротекция

I.V. Barskov¹, E.V. Stelmashuk², G.A. Romanova¹, L.G. Khaspekov²

Morphological study of neuroprotective properties of dipeptide mimetic of nerve growth factor (GK-2h) in focal ischemic damage of rat brain prefrontal cortex

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² Research Center of Neurology RAMS, 80, Volokolamskoye hwy., Moscow, 125367, Russia

The neuroprotective effects of dipeptide GK-2h, a mimetic of nerve growth factor, in bifocal photoinduced ischemia in rat brain prefrontal cortex was studied. It was shown that GK-2h, injected intraperitoneally in dose 0,1 mg/kg in 1 h or 4 h after operation and then on 2-nd, 4-th and 8-th days, prevented significantly on 9-th day from increasing volume of cortical infarction.

Key words: nervous growth factor mimetic, bifocal photoinduced ischemia, rat brain prefrontal cortex, neuroprotection

Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что инсульт является одной из ведущих причин смертности в развитых странах [1]. В фармакотерапии инсульта нейропротекция рассматривается как важнейший этап лечебных мероприятий [2, 3]. Поиск лекарственных средств, снижающих степень нейродегенерации и улучшающих мнестические функции при ишемии мозга, является актуальной фармакологической проблемой. Нейропротекторным эффектом обладают многие соединения, имеющие различный механизм действия. Исходя из патогенетических механизмов инсульта и известных данных о процессах сохранения и восстановления жизнеспособности нервной ткани, особое внимание уделяется нейротрофинам [5, 11, 13].

В результате многолетних фундаментальных исследований в Институте фармакологии им. В.В. Закусова РАМН создан оригинальный дипептидный миметик нейротрофического фактора роста нервов (ФРН) человека (ГК-2h), изучение которого в опытах *in vitro* дало основание предположить, что это соединение обладает нейропротекторными свойствами [8].

Цель исследования — изучение нейропротекторных свойств ГК-2h при фотоиндуцированном тромбозе кровеносных сосудов коры головного мозга крысы — экспериментальной модели, воспроизводящей клиническую картину фокального ишемического инсульта [6, 12, 14]. Данная модель ранее валидизирована с использованием препаратов, обладающих нейропротекторным и антимнестическим действием и применяемых для фармакологической коррекции ишемической церебральной патологии [6, 9, 12, 16].

Для корреспонденции: Романова Галина Александровна, д-р биол. наук, зав. лаб. гипоксических повреждений мозга ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: romanovaga@mail.ru

Методика

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

Все экспериментальные животные были разделены на 4 группы:

- группа 1 — ложнооперированные;
- группа 2 — фототромбоз с введением 0,9%-ного раствора NaCl (физраствор);
- группа 3 — фототромбоз с введением ГК-2h через 1 ч, 2, 4 и 8 сут. после операции;
- группа 4 — фототромбоз с введением ГК-2h через 4 ч, 2, 4 и 8 сут. после операции.

ГК-2h вводили внутривенно в дозе 0,1 мг/кг.

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс (поля Fr1 и Fr2, согласно атласу [15]), создавали методом фотоиндуцированного тромбоза [19]. Животных наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг, в/б). Фотосенсибилизирующий краситель бенгальский розовый (Sigma Chem. Co.) вводили в яремную вену (3%-ный раствор в воде, 40 мг/кг). Голову животных фиксировали в стереотаксисе и после продольного разреза кожи удаляли надкостницу.

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

Головной мозг у всех животных извлекали на 9-е сут. после индукции фототромбоза. Под глубоким наркозом (3% хлоралгидрат) производили суправитальную транскардиальную перфузию, сначала физиологическим раствором, затем фиксирующей смесью спирта, формалина и ледяной уксусной кислоты (ФУС) в отношении 7:2:1 соответственно [4]. Срезы мозга толщиной 100 мкм окрашивали крезильовым фиолетовым по методу Ниссля. Далее препараты обрабатывали по стандартной гистологической методике: обезвоживали в спиртах восходящих концентраций, просветляли в ксилоле и заключали в балъзам.

Для морфометрического измерения площади очага серийного среза и объема ишемического повреждения мозг фиксировали методом погружения в ФУС. После фиксации материал переносили на сутки в 70%-ный спирт и резали в дистиллированной воде на

вибротоме 1000 (Technical Product international inc., USA) с шагом 100 мкм. Каждый второй срез последовательно монтировали на предметных стеклах, покрытых желатиной, и окрашивали 0,2% метиленовым синим. Гистологические препараты сканировали на слайдовой приставке сканера V100 PHOTO (Epson, USA). Этот метод позволяет получить файл с изображением среза мозга нежно-голубого цвета, на котором четко виден очаг ишемического повреждения — темноокрашенный по краю в зоне некротической гибели клеток, и светлый в середине — зоне глио-мезодермального рубца (рис. 2). Иногда некротическая ткань распадается, в таком случае очагом поражения считали недостающий участок ткани. Для определения площади ишемического повреждения использовали специализированную компьютерную программу ImageJ («Bethesda», США).

Объем очага повреждения определяли по формуле:

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

где:

d — толщина пары срезов (200 мкм);

S_n — измеренная площадь ишемического очага серийного среза в мм²;

Σ — сумма объемов ишемического повреждения на срезах.

Коэффициент эффективности защиты (КЭЗ) рассчитывали по формуле:

$$КЭЗ = (V_0 - V_B) / V_{0X} \times 100\%,$$

где:

V_0 — средний объем очага поражения с введением физраствора;

V_B — средний объем очага поражения с введением препарата.

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

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 6.0». Нормальность распределения признака в выборке оценивали по W-критерию Шапиро—Уилка. Для статистического анализа объемов инфаркта использовали тест ANOVA с посттестом Dunnett's Multiple Comparison. Отличия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее \pm SEM.

Результаты и обсуждение

На гистологических срезах префронтальной коры головного мозга, взятых у животных 2-й группы (без введения ГК-2h) и окрашенных по методу Ниссля, в ишемическом очаге выявлялась зона тотального некроза, содержащая необратимо поврежденные нейроны, и зона так называемой «пенумбры» (от лат. ре-

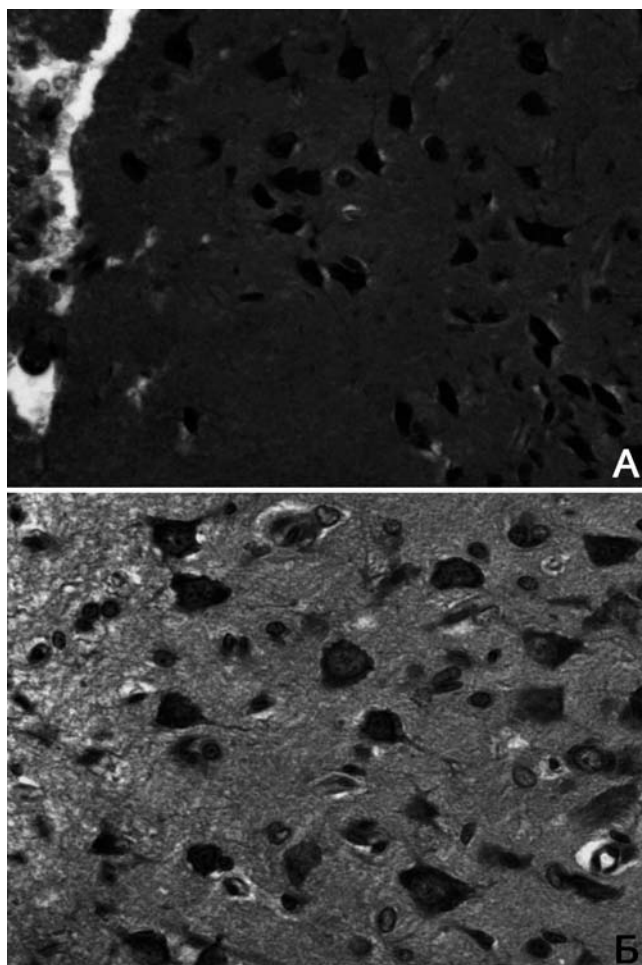


Рис. 1. Гистологические срезы префронтальной коры головного мозга крысы через 9 сут. после фотоиндуцированного тромбоза. А — в отсутствие ГК-2h; Б — в присутствии ГК-2h, введенного через 4 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза. Окраска по методу Ниссля. Масштаб 30 мкм.



Рис. 2. Одноуровневые фронтальные срезы мозга крыс через 9 сут. после двустороннего фототромбоза. 1 — в отсутствие ГК-2h; 2 — в присутствии ГК-2h, введенного через 1 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза; 3 — в присутствии ГК-2h, введенного через 4 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза. Окраска метиленовым синим. Темноокрашенная область очага — зона некроза, центральная область — глиомезодермальный рубец. Масштаб 3 мм.

pumbra — полутень), в которой обнаруживались нейроны с признаками повреждения (перичеллюлярный отек, гиперхромность, сморщивание тел нейронов, гомогенизация цитоплазмы, исчезновение глубоких хроматина, изменение конфигурации ядра), характерными для данной стадии постишемического периода (рис. 1 А). Наблюдались также выраженный периваскулярный отек с диффузным смещением клеточных структур.

В гистологических препаратах головного мозга животных 3-й и 4-й групп некротические изменения в префронтальной коре были менее значительны. В пenumбре преобладали нейроны с минимально измененной структурой (рис. 1 Б), а периваскулярный отек был выражен слабее.

При сопоставлении отдельных срезов и при пространственной реконструкции очагов ишемического повреждения мозга животных 2-й, 3-й и 4-й групп защитный эффект ГК-2h отчетливо выражен (рис. 2 и 3). Морфометрическое исследование показало, что общий объем повреждения коры головного мозга крысы при двустороннем фототромбозе в отсутствие ГК-2h составил в среднем 29 мм^3 (примерно 2% объема всего мозга), при этом мозг ложнопериорированных крыс оставался интактным. Средний объем ишемического очага во 2-й группе животных составил $14,0 \pm 3,1 \text{ мм}^3$ ($n = 5$), тогда как в 3-й группе — $7,4 \pm 1,1 \text{ мм}^3$ ($n = 6$, $p < 0,05$, отличие от животных 2-й группы), а в 4-й — $4,9 \pm 1,3 \text{ мм}^3$ ($n = 5$, $p < 0,01$, отличие от животных 2-й группы). Рассчитанные коэффициенты эффективности защиты в 3-й и 4-й группах составили соответственно 47 и 65%.



Рис. 3. Объемная реконструкция очагов ишемического повреждения при двустороннем фототромбозе. 1 — в отсутствие ГК-2h; 2 — в присутствии ГК-2h, введенного через 1 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза; 3 — в присутствии ГК-2h, введенного через 4 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза. Окраска метиленовым синим. Масштаб 3 мм.

На сегодняшний день все имеющиеся нейропротекторы, испытанные в мультифокальных клинических исследованиях, недостаточно эффективны [17], поэтому разработка новых подходов к терапии и профилактике инсульта является важнейшей задачей фундаментальной медицины [3]. В настоящее время большое внимание уделяется созданию нейропротекторных средств, значительное место в которых занимают полипептиды и ростовые факторы [7, 9, 12, 16, 18].

В наших экспериментах показана более высокая эффективность соединения ГК-2h при введении через 4 ч, чем через 1 ч, после ишемического повреждения коры, что свидетельствует о повышении терапевтической активности препарата в ходе развития ишемии. Таким образом, увеличивается длительность терапевтического окна и расширяется период эффективности лечебного применения ГК-2h.

Исследование действия ГК-2h на моделях окислительного стресса, глутаматной токсичности и 6-оксидоаминового повреждения клеток *in vitro* показало наличие у данного низкомолекулярного пептидного аналога ФРН нейропротекторной активности, проявляемой в малых концентрациях и сходной с активностью самого ФРН [8]. Полученные результаты подтверждают обнаруженные в опытах *in vitro* нейропротекторные свойства ГК-2h и свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки препарата в качестве потенциального противоишемического средства.

Список литературы

1. Болезни нервной системы. Руководство для врачей в 2-х т. / Под ред. Яхно Н.Н., Штульмана Д.Р. 3-е изд-е, перераб. и доп. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф. и др. // Журнал неврологии и психиатрии. — 1997. — №6. — С. 26—34.
3. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / Под ред. З.А. Суслиной, М.А. Пирадова. — М.: Медпресс-Информ, 2008. — 288 с.
4. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. — М.: Мир, 1969. — С. 40.
5. Пальцын А.А., Константинова Н.Б., Шакова Ф.М., Кубатиев А.А. Роль слияния клеток в физиологической и репаративной регенерации коры головного мозга // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2009. — Т. 148, №5. — С. 580—583.

6. Романова Г.А. Дизрегуляционное нарушение интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // Дизрегуляционная патология: Руководство для врачей и биологов / Под ред. Г.Н. Крыжановского. — М.: Медицина, 2002. — С. 605—615.

7. Романова Г.А., Силачев Д.Н., Шакова Ф.М. и др. Нейропротективное и антиамнестическое действие пептида семакса при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга // Бюлл. Экспер. биол. — 2006. — Т. 142, №12. — С. 618—621.

8. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Заявка на изобретение рег. №2009105176, приоритет от 16.02.2009.

9. Шакова Ф.М., Давыдова Т.В., Романова Г.А. Влияние антител к глутамату на сохранение памяти и уровень нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга крыс при ишемическом повреждении префронтальной коры // Патогенез. — 2013. — Т. 11, №2. — С. 49—63.

10. Connor B., Dragunow M. // Brain Res. Rev. — 1998. — Vol. 27. — P. 1—39.

11. Ford G.A. Clinical pharmacological issues in the development of acute stroke therapies // Brit. J. Pharm. — 2008. — Vol. 153. — P. 112—119.

12. Ostrovskaya R.U., Romanova G.A., Barskov L.V. et al. // Behav. Pharmacol. — Memory restoring and neuroprotective effects of the proline-containing dipeptide, GVS-111, in a photochemical stroke model. — 1999. — Vol. 10(5). — P. 549—553.

13. Pollack S.J., Harper S.J. // Drug News and Perspectives. — 2002. — Vol. 15 (5). — P. 268—277.

14. Padosh S.A., Vogel P., Bottiger B.W. Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies // Anaesthesist. — 2001. — Vol. 50 (12). — P. 905—920.

15. Paxinos G., Watson S. Atlas of anatomy of rat brain. The rat brain in stereotaxic coordinates. — San Diego: Academic Press, 1986.

16. Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M. Neuroprotective and anti-amnestic actions of Semax in experimental ischemic cerebral cortical infarct // Bull. Exp. Biol. Med. — 2006. — Vol. 142 (12). — P. 612—628.

17. Rother J. Neuroprotection does not work // Stroke. — 2008. — Vol. 39. — P. 523—524.

18. Sutherland B.A., Minnerup J., Balami J.S. Neuroprotection for ischaemic stroke: Translation from the bench to the bedside // Int. J. Stroke. — 2012. — Vol. 7. — P. 407—418.

19. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis // Ann. Neurol. — 1985. — Vol. 17 (5). — P. 497—504.

Поступила 02.10.13

Сведения об авторах:

Барсков Игорь Валентинович, канд. мед. наук, лаб. гипоксических повреждений мозга ФГБУ «НИИОПП» РАМН
 Стельмашук Елена Викторовна, д-р биол. наук, лаб. экспериментальной нейрцитологии, отд. исследований мозга ФГБУ «НЦН» РАМН
 Хаспеков Леонид Георгиевич, д-р биол. наук, рук. лаб. экспериментальной нейрцитологии, отд. исследований мозга ФГБУ «НЦН» РАМН