

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ
И НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ

на правах рукописи

Голобородько Евгений Владимирович

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО
ДЕЙСТВИЯ КОРКОВЫХ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

03.00.13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва-2007

Работа выполнена в Лаборатории ультраструктурных и цитохимических основ условного рефлекса (заведующий – д.б.н., профессор Н.С. Косицын) Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (директор – д.б.н., профессор П.М. Балабан).

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор биологических наук, профессор
Н.С. Косицын

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор
М.Г. Айрапетянц

Доктор медицинских наук, профессор
Ю.В. Урываев

Ведущее учреждение:

Кафедра нормальной физиологии Медицинского факультета
Российского университета дружбы народов

Защита состоится 28 марта 2007 г. в _____ часов на заседании специализированного ученого совета (Д-002.044.01) Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (г. Москва, ул. Бутлерова, 5а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИВНД и НФ РАН.
Автореферат разослан « _____ » февраля 2007 г.

Ученый секретарь специализированного совета
Доктор биологических наук, профессор

В.В. Раевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Методический арсенал, сформировавшийся в современной нейробиологии, позволяет достаточно полно изучать особенности возникновения и развития процесса нейродегенерации. Одним из способов изучения структуры и функции мозга в норме и патологии является использование экспериментальных моделей заболеваний, в основе которых лежит поражение структурных элементов нервной ткани (Karwacki Z., 2006; MacLellan C., 2006; Gharbawie O., Whishaw I., 2006). Частной задачей таких исследований является поиск лекарственных средств, обладающих нейропротекторным эффектом, которые могут применяться при коррекции поражений ткани мозга.

Сосудистые заболевания головного мозга среди всех причин смерти населения вышли в России на второе место (после кардиоваскулярных заболеваний), а также на первое место, как причина стойкой утраты трудоспособности. 10% больных становятся тяжелыми инвалидами, многие из них нуждаются в посторонней помощи (Скворцова В.И., Крылов В.В., 2005).

Среди них выделяют инсульт ишемический (в основе его патогенеза лежит резкое снижение притока крови) и геморрагический (вследствие внутримозгового кровоизлияния). По данным международных мультицентровых исследований, преобладают ишемические поражения мозга (соотношение ишемического и геморрагического инсультов составляет в среднем 85% и 15%) (Завалишин И.А., Захарова М.Н., 1999). Однако геморрагическая форма протекает более тяжело, чем ишемическая, характеризуется более высокой смертностью (50% всех заболевших), трудностью реабилитации и более высокой степенью инвалидизации больных (88%). К концу первого года после инсульта из-за протекающих в головном мозге постинсультных изменений летальность увеличивается еще на 12-15%.

При геморрагическом инсульте происходит прорыв крови в вещество мозга и образование внутримозговой гематомы («ядра» инсульта), места тотальной деструкции нервной ткани. Прямое механическое сдавливание мозга вокруг гематомы и некоторое влияние вазоконстрикторных веществ в излившейся крови приводят к нарушению кровоснабжения окружающей нервной ткани (Warach S., 2003). Таким образом, внутримозговую гематому окружает периинсультная зона пенумбра, в которой инициируется ряд процессов, приводящих в прогрессирующей гибели структурных элементов нервной ткани (White B., 2000). Последние исследования позволили раскрыть ряд общих механизмов гибели нервных клеток, лежащих в базисе не только инсульта, но и ряда нейродегенеративных заболеваний. К этим механизмам относят «эксайтотоксичность» - токсическое действие на нейроны повышенных концентраций возбуждающих аминокислот, «оксидантный стресс» - повреждение мембран нейронов активными формами свободных радикалов кислорода и продуктов перекисного окисления липидов, а также инициация апоптоза (Nakamura T., 2005; Goldstein L., 2003; White B., 2000). Нейропротекция поражений структурных элементов нервной ткани в пенумбре, направленная на увеличение их выживаемости, снижает выраженность функциональных последствий кровоизлияния.

Наиболее часто встречаемое место локализации гематом - стриатокангулярная зона (Frost S., 2006; Kumon Y., 1996). Внутренняя капсула, входящая в ее состав, является своеобразным коллектором, через который проходят связи коры больших полушарий головного мозга с нижележащими структурами. В связи с этим при локализации гематомы в области внутренней

капсулы нарушения двигательной сферы более выражены, чем при поражении соответствующих первичных двигательных зон коры.

Область внутренней капсулы в комплексе с другими структурами мозга почти всегда подвергается патологическому воздействию и при моделировании экспериментальной гипоксии/ишемии (окклюзия средней мозговой артерии, перинатальная асфиксия) (He Z., 2000; He Z., 1999; Iizuka H., 1989). Кроме того, известно, что нейроны стриатокapsулярной зоны являются высокочувствительными к гипоксическому/ишемическому воздействию клеточными структурами головного мозга (Schabitz W., 2000; Pulsinelli W., 1982). Несмотря на это, большинство экспериментальных работ по изучению постинсультных дегенеративных процессов проводятся на примере других структур, в частности, полей CA1 и CA3 гиппокампа. В одном из наиболее известных обзоров по ишемии (Lipton P., 1996), процесс дегенерации структурных элементов нервной ткани описан на их примере. Особенности морфологических изменений в других областях мозга, в частности, в области внутренней капсулы, остаются малоизученными. Кроме этого, данные о структурных изменениях в области внутренней капсулы, возникающих вследствие экспериментального геморрагического а не ишемического инсульта, практически отсутствуют. В связи с этим изучение особенностей структурных изменений и динамики функциональных последствий в результате моделирования локального поражения в области внутренней капсулы представляется особенно актуальным.

Большее число существующих методов моделирования геморрагического инсульта, по мнению Gharbawie (2006), не дает возможность проводить изучение динамики улучшения функционального статуса животных в кратчайшие сроки после операции. Модель локального экспериментального геморрагического инсульта, позволяющая проводить такую оценку, может также стать и моделью для доклинических испытаний лекарственных средств, обладающих протекторными свойствами (MacLellan, 2006).

Из практики нервных болезней известно, что возникающий в ходе перенесенного инсульта неврологический дефицит не всегда напрямую связан с пораженной областью. Описаны случаи возникновения клинически значимых симптомов и синдромов, связанных с функциональными изменениями в удаленных зонах мозга по типу диахизиса (Flint AC, 2006). Диахизис – частный случай пластичности мозга, феномен, обозначающий появление функциональных изменений в областях мозга анатомически или функционально связанных с патологическим очагом (Monakow, 1914) (в результате снижения афферентного притока из разрушенной области). По мнению Paradowski B. (2005) возникновение изменений по типу диахизиса является неотъемлемой частью генеза многих нейродегенеративных заболеваний. Кроме этого, в настоящее время рядом авторов предлагается использование клинической оценки диахизиса в практической неврологии (Duffau H., 2006). Таким образом, актуальной представляется задача оценки наличия и выраженности структурных изменений в связанных с инсультным очагом (внутренняя капсула) анатомическими связями отдаленных областях (кора больших полушарий головного мозга).

Принимая во внимание полимодальную картину геморрагического инсульта, для его лекарственной коррекции, по мнению White et al. (2000), необходим политерапевтический подход, направленный кроме увеличения выживаемости нейронов на инициацию пластичных перестроек в здоровой ткани, приводящих к

компенсации приобретенного неврологического дефицита. Возможно, поэтому ни один из используемых в настоящее время при лечении инсульта узкоспециализированных лекарственных препаратов (по данным American Heart Association, 1997), не обладает клинически выраженными нейропротекторными свойствами.

Качественно новым подходом к лечению геморрагического инсульта может стать использование нейротрофических факторов мозга (Nicole O., 2001). Нейротрофины – эндогенные пептиды головного мозга, участвующие в контроле процессов физиологического развития нейронов, сохранения структурной и функциональной целостности нервных или глиальных клеток. Различные факторы роста, обеспечивающие трофическую поддержку нейронов, проявляют защитное действие на моделях повреждения нейронов *in vitro* (Hutter-Paier B., 1998). Существенной представляется нейропротекторная роль нейротрофинов в процессах, связанных с дегенерацией нервной ткани (Dechant G., 2002). Однако, в настоящее время ни один из препаратов, обладающих нейротрофической активностью не введен в клиническую практику. Одна из причин заключается в том, что такие молекулы не в состоянии проникать через гематоэнцефалический барьер. С этим связана необходимость применения инвазивных терапевтических стратегий, например, инфузии препарата непосредственно в желудочки головного мозга.

Будучи высоколабильным образованием, кора больших полушарий головного мозга при определенных условиях может повышать лабильность подкорковых центров (И.П. Павлов, 1932; П.К. Анохин, 1964; В.Н. Казаков, П.Я. Кравцов, 1978). В связи с этим было высказано предположение, что при действии экстремальных или патологических факторов в коре больших полушарий головного мозга может происходить индукция выработки ряда факторов, обладающих протекторными свойствами (Батрак Г.Е., 1981). Из данных литературы известно, что нейротрофины и пептидные факторы активно синтезируются при экспериментальной мозговой травме и внутримозговой геморрагии (Rosenberg et al., 1992; Kawamata et al., 1996; Xue, Del Bigio, 2000). В ходе предварительно проделанной работы (Макаренко А.Н., 1998) в нашей лаборатории была разработана методика получения вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт. В дальнейшем, было показано, что на модели культуры нейронов *in vitro* эта вытяжка увеличивала выработку мРНК ФРН и синтез этого нейротрофического фактора (Макаренко А.Н., 2004). В настоящем исследовании на модели экспериментального геморрагического инсульта в области внутренней капсулы нами также оценивалась выраженность нейропротекторного эффекта вытяжки из коры головного мозга животных успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, что может явиться основой для разработки нового лекарственного средства для терапевтической коррекции постинсультных состояний головного мозга.

Цель работы: структурно-функциональный анализ нейропротекторного действия вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, на модели данной цереброваскулярной патологии.

Задачи работы:

1. Структурная характеристика особенностей нейродегенеративных процессов при экспериментальном геморрагическом инсульте.
2. Оценка функциональных последствий моделирования локального кровоизлияния в области внутренней капсулы.
3. Структурно-функциональная характеристика эффективности и особенностей нейропротекторного действия вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, на модели данной патологии.
4. Исследование выраженности противоинсультного действия отдельных фракций исследуемой вытяжки.

Положения, выносимые на защиту:

1. На модели экспериментального геморрагического инсульта показано, что нейродегенерация в периинсультной зоне заключается в прогрессирующей дегенерации нейронов и их отростков. Наиболее уязвимыми клеточными структурами являются мелкие нейроны вне зависимости от их гистохимического субтипа.
2. Функциональные изменения, происходящие после моделирования геморрагического инсульта обусловлены как гибелью нейронов в периинсультной зоне, так и дегенеративными изменениями в отдаленных областях головного мозга (кора больших полушарий), связанных с зоной поражения.
3. Вытяжка из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, обладает эффективным противоинсультным действием, приводящим к компенсации функциональных последствий инсульта, оказывая нейропротекторное действие в периинсультной зоне и купируя нейродегенеративные процессы в отдельных компонентах нервной клетки в отдаленных областях головного мозга (кора больших полушарий), связанных с зоной поражения. Обоснована перспективность ее дальнейшего фракционирования с целью выделения нового противоинсультного моно вещества.

Научная новизна работы: В ходе проведенных исследований нами впервые было показано, что уровень гибели нейронов в областях мозга, прилежащих к очагу экспериментального геморрагического инсульта в большей степени зависит от размеров их клеточных тел. Уже через 24 часа после операции наблюдалось достоверное снижение количества в основном мелких нейронов в периинсультной области, которое продолжало снижаться вплоть до 21 дня после операции. Нами также было выявлено отсутствие корреляционной взаимосвязи между типологической принадлежностью нейронов, определяемой методом

иммуногистохимического анализа, и величиной их гибели в пенумбре экспериментального геморрагического инсульта.

При моделировании геморрагического инсульта в области внутренней капсулы нами были описаны морфологические изменения в области головного мозга, отдаленной от очага инсульта (кора больших полушарий). Так, при локализации гематомы в области внутренней капсулы, нами наблюдалось снижение числа шипиков на апикальных дендритах пирамидных нейронов V слоя сенсомоторной коры больших полушарий головного мозга.

Изменения структурных компонентов нервной ткани при моделировании локального кровоизлияния в области внутренней капсулы приводили к следующим функциональным последствиям: в начальном угнетении ориентировочно-исследовательской и двигательной активности крыс, которая нарастала по 3 неделю включительно и переходила в гиперактивность (тест «открытое поле»). Двигательная гиперактивность крыс совпадала со снижением латентного периода условного рефлекса пассивного избегания, что говорило о нарушении тормозных процессов. Тонкие манипуляционные движения нарушались и к 3 неделе постинсультного периода полностью не восстанавливались.

По динамике морфологических и поведенческих последствий локального кровоизлияния в области внутренней капсулы была показана эффективность применения в качестве терапевтического средства, обладающего выраженными нейропротекторными и нейромодуляторными свойствами, вытяжки из коры больших полушарий головного мозга животных, успешно перенесших геморрагический инсульт. Нами было проведено четыре серии экспериментов по фракционированию вытяжки с последовательным выделением фракции, обладающей наиболее выраженным протекторным действием, для дальнейшего разделения. В результате была получена субфракция, состоящая из ограниченного числа компонентов, которая перспективна для выделения нового моно вещества, обладающего протекторными свойствами.

Полученные данные позволяют расширить существующие представления о нейродегенеративных изменениях, протекающих при геморрагическом инсульте. Они также позволяют подтвердить гипотезу о противоинсультном, в частности, нейропротекторном действии вытяжки из коры больших полушарий головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт и показывают перспективность ее последовательного фракционирования с целью получения нового противоинсультного моно вещества. Кроме того, полученные данные позволяют расширить представления о функционировании коры больших полушарий головного мозга при экстремальных воздействиях и различных видах патологии.

Практическая ценность работы. Вытяжка из коры больших полушарий головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, обладающая (по результатам настоящего исследования) выраженным нейропротекторным эффектом, может найти применение в клинической неврологии в качестве терапевтического средства при лечении геморрагического инсульта. Полученные данные о нейропротекторном действии отдельных компонентов вытяжки позволяют сделать заключение о перспективности продолжения данной работы с целью получения нового моно вещества, которое также может найти применение в практической медицине.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры высшей нервной деятельности МГУ, анатомии и физиологии МГПУ.

Апробация работы: Материалы диссертации были представлены на Конференции молодых ученых по проблемам высшей нервной деятельности, посвященной 90-летию со дня рождения чл.-корр. АН и АПН СССР Л.Г. Воронина (Москва, 1998); Второй российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии, экспериментальной и клинической медицины» (Орел, 2001); XVI зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2004); Конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» (Москва, 2004) (работа отмечена дипломом конференции); 14-ой Международной конференции по нейрокибернетике, посвященной 60-летию победы советского народа в Великой Отечественной войне и 90-летию Ростовского государственного университета (Ростов-на-Дону, 2005); Международной конференции "Колосовские чтения - 2006" (Санкт-Петербург, 2006) и на научных конференциях молодых ученых Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН в 2002, 2003, 2004, 2005 и 2006 гг.

Результаты работы были использованы в докладе на Общем собрании ОБН РАН, 2006 и представлены к публикации в сборнике-справочнике «Отделение биологических наук РАН в 2005 году. Основные результаты научных исследований».

Диссертация апробирована на совместном заседании группы ультраструктурных и цитохимических основ условного рефлекса, лаборатории функциональной нейроморфологии, группы общей физиологии временных связей, группы экспериментальной патологии и терапии ВНД Института 29 ноября 2006 года.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них 2 статьи в реферируемых журналах.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и иллюстрирована 33 рисунками. Список литературы включает 106 наименований отечественной и зарубежной литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования.

Эксперименты проводились на 223 крысах-самцах линии Вистар массой 200-300 г. согласно Директивы Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных в экспериментальных целях.

Экспериментальная часть работы состояла из следующих блоков: структурная характеристика специфики нейродегенеративных процессов при экспериментальном геморрагическом инсульте; оценка функциональных последствий моделирования локального кровоизлияния в области внутренней капсулы; структурно-функциональная характеристика эффективности и специфики

нейропротекторного действия вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, на модели данной патологии; исследование выраженности противоинсультного действия отдельных фракций исследуемой вытяжки.

У 131 крысы в области внутренней капсулы (координаты: $H=4$ мм, $L=3.0$ мм, $A=-1.5$ мм) от брегмы по атласу Paxinos G. et al.) под нембуталовым наркозом в доминантном полушарии моделировался биполушарный геморрагический инсульт по методу, разработанному в нашей лаборатории (А.Н. Макаренко, 2001). Суть данного метода заключалась во введении в ткань мозга через направляющую иглу-канюлю мандрена-ножа, с помощью которого производилась механическая деструкция нервной ткани в очаге поражения. Затем, через эту же канюлю через 2-3 мин гамильтоновским шприцем вводилась аутокровь животного, взятая из хвостовой вены в количестве 0.1-0.14 мл, в область деструкции мозговой ткани. Используемый подход позволял смоделировать базисные патогенетические составляющие геморрагического инсульта: масс-эффект излившейся крови, действие продуктов ее распада и периинсультное воспаление. К числу достоинств данного метода можно также отнести его стереотаксичность и возможность моделировать поражение определенного малого объема, позволяющего определить динамику восстановительных процессов в максимально короткий срок (рис. 1).

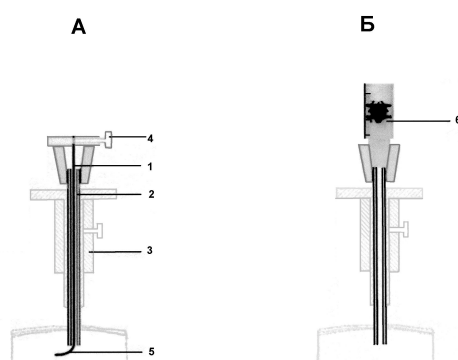


Рисунок 1. Принципиальная схема устройства для моделирования локального кровоизлияния в образования мозга (А – устройство в положении с выдвинутым мандреном-ножом. 1 - вольфрамовый мандрен - нож; 2 - направляющая игла - канюля; 3 - держатель стереотаксического прибора; 4 - фиксатор верхнего участка мандрена - ножа; 5 - режущий нижний конец мандрена-ножа; 6 – введение аутокрови. Б – устройство в положении, при котором оно погружается в структуры мозга)

Остальные 52 животных служили ложнооперированным контролем. У них также производилось рассечение кожных покровов, трепанация черепа с последующим введением канюли, но без употребления мандрена-ножа и без введения аутокрови.

Нами определялись наличие, выраженность и специфичность нейропротекторного действия факторов, индуцируемых в коре больших полушарий головного мозга животных в результате успешно перенесенного патологического процесса, протекающего с поражением нервной ткани. В течение недели до операции все крысы приучались к интраназальным и внутрибрюшинным инъекциям. Затем, в течение 10 дней после операции 1 раз в день внутрибрюшинно (2 мл/кг) и интраназально (0,05 мл) животным вводился супернатант гомогената вытяжки из коры больших полушарий головного мозга свиней, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт. Терапевтическая эффективность исследуемой вытяжки анализировалась в сравнении с плацебо

(изотонический NaCl), с фракцией вытяжки не обладающей нейропротекторной активностью и по сравнению с аналогичным по составу препаратом с доказанной эффективностью («Церебролизин»).

Для достижения максимальной концентрации исследуемой вытяжки в головном мозге нами были использованы два разных метода инъекций. В норме основным ограничением для системного введения вытяжки является ограниченная проницаемость гематоэнцефалического барьера. Однако считается, что в пенумбре геморрагического инсульта она резко возрастает. Таким образом, внутрибрюшинное введение исследуемой вытяжки в постинсультный период является обоснованным.

Интраназальный способ введения также является способом преодоления ГЭБ. Это объясняется возможностью аксонального транспорта веществ по ольфакторному тракту, взаимодействием с нервными рецепторами в области верхних хоан, диффузией по межклеточному пространству к рецепторам (Domino et al., 2000; Fishbein et al., 2000; Lloyd et al., 2000). Существование такого внесистемного пути доставки позволяет достигать выраженный терапевтический эффект при введении ультрамалых доз нейроактивных лекарственных препаратов (преимущественно гормонов и веществ пептидной природы) (Ашмарин И.П., 1988).

Вытяжка из коры головного мозга свиней, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, в количестве, необходимом для проведения экспериментов, была произведена на опытном производстве предприятия «Днепрофарм», Украина. Дальнейшая препаративная наработка и фракционирование вытяжки осуществлялись совместно с Группой аналитической химии белка Института Биоорганической Химии РАН.

После тестирования наличия, выраженности и специфики противоинсультного действия вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, нами изучалось действие фракций и субфракций этой поликомпонентной вытяжки с целью выделения нового противоинсультного моновещества. Было проведено четыре серии экспериментов ($n_1=33$, $n_2=32$, $n_3=33$, $n_4=33$), в каждой из которых последовательно выбиралась субфракция, обладающая максимальным фармакологическим эффектом.

Динамика изменений функционального уровня животных после операции моделирования экспериментального геморрагического инсульта в контроле, при введении исследуемой вытяжки или отдельных ее фракций, а также ложнооперированных животных оценивалась по нижеследующим показателям, которые нормировались по отношению к их предоперационному уровню.

Неврологический дефицит определяли один раз в день на протяжении 10 суток после операции в тесте поворота на наклонной плоскости, ходьбы по бревну, растопыривания пальцев конечностей на плоскости, по латентности падения из положения виса на турнике и вычисляли коэффициент по Rosenberg G. (1990), с модификацией.

Ориентировочно-исследовательская и двигательная активность животных оценивалась в тесте «открытое поле». Животное помещалось в большую прямоугольную камеру (100X100 см) с деревянными стенками высотой 40 см. Полком служил лист черного пластика, на который была нанесена решетка, делящая поле на 25 (5X5) равных квадратов. Крысу помещали в угол камеры и наблюдали

за ее поведением в течение 5 мин. Как только животное вступало на новый квадрат обеими передними лапами, это регистрировалось. Число посещений 16-ти периферийных квадратов (прилегающих к стенкам) регистрировали отдельно от числа посещений 9 внутренних квадратов. После 5 мин. исследования животное возвращали в клетку. Подсчитывалось число посещенных крысой квадратов, число стоек, число замираний животного и их время, число катышков помета (болей). Пол тщательно мыли после каждого теста

Общую исследовательскую активность оценивали в процессе проведения теста "норковый рефлекс". Для этого в центре каждого квадрата, из которых состояло «открытое поле», было проделано отверстие диаметром 3 см. При проведении теста "норковый рефлекс" регистрировалось каждое норковое движение крысы в отверстие для обнюхивания.

У животных также оценивали динамику восстановления тонких манипуляционных движений в тесте на сохранность тонких манипуляционных движений передней конечностью (по Whishaw I., 1986), так как нарушение координации тонких движений - один из основных исходов геморрагического инсульта у людей. В этом тесте животное помещалось в клетку из металлических прутьев диаметром 2 мм, расстояние между ними составляло 11 мм. С наружной стороны на всем протяжении стенки клетки на высоте 4 см от пола располагался лоток с семечками, шириной 6 см и глубиной 1 см. Пол клетки был также решетчатый, чтобы крыса в случае выпадения семечка из лапы, теряла ее вовсе. Перед каждым проведением теста крысы подвергались 24-часовой пищевой депривации. До операции крыса обучалась доставать лапой семечко в течение 2 тренировок по 1 часу, во время которых в одной клетке находилось по 3 крысы. Затем, также до операции, производилась регистрация числа движений лапой и количества съеденных и потерянных семечек. Эта процедура повторялась 2 раза по 10 мин, в течение нее в клетке находилось по 1 крысе.

Сохранность тормозных процессов оценивалась по времени латентного периода условной реакции пассивного избегания. Крыса помещалась в вытянутую пластмассовую камеру с электрифицированным решетчатым полом. Стены и потолок одной половины комнаты были выкрашены в черный цвет, а в другой половине они были прозрачны. Лампочка мощностью 100 Вт крепилась на высоте 40 см над светлой частью камеры. Как только крыса вступала в темный отсек при последней попытке ознакомления, подавали удар тока (50 Гц, 1,5 мА в течение 1 с). Затем крысу сразу же переводили в жилую клетку. Этап обучения повторялся два раза. Для регистрации времени условной реакции пассивного избегания, характеризующего торможение, животное помещали в освещенную половину и устанавливали латентный период входа в темноту. Тест заканчивался, когда животное вступало в темный отсек или если животное не делало этого в течение 3 мин.

Все исследования, связанные с регистрацией поведения животных проводились в осенне-зимний период в одно и то же время суток (после 16:00).

Схема проведения поведенческой части исследования

Название теста	До операции, день	После операции, день
Неврологическое тестирование	-	1-10
Открытое поле	-13, -7	2; 3; 4; 6; 9; 11; 12; 17; 21
Тест на сохранность тонких манипуляционных движений	-5, -2	5; 10; 20
Условная реакция пассивного избегания	- 9	5; 9; 20

С целью анализа динамики дегенеративно-регенеративных процессов нами определялись объем инсультного очага, величина гибели нейронов в прилегающих областях, а также морфологические изменения в отдаленных областях головного мозга: характер распределения шипиков на апикальных дендритах пирамидных нейронов V слоя коры больших полушарий. Все подсчеты производились двумя независимыми исследователями.

Оценку объема инсультного повреждения, динамики нейродегенеративных процессов и контроль топологии очага внутримозговой гематомы производили по фронтальным срезам мозга. Мозг крыс фиксировали интракардиальной перфузией 4% раствора параформальдегида на 0,1M фосфатном буфере (pH=7,4), обезвоживали, заливали в парафин и делали срезы на микротоме "Histo-range" (LKB) толщиной 6 мкм с шагом 200 мкм, после чего срезы окрашивали по методу Ниссля.

Оценка морфологических изменений в отдаленных от кровоизлияния областях мозга производилась на 60 мкм срезах сенсомоторной области коры головного мозга, окрашенных по методу Гольджи. Подсчитывалось среднее число шипиков на 10 мкм длины апикального дендрита пирамидного нейрона V слоя коры в интервале от 30 до 500 мкм от тела клетки.

Нами также оценивалась величина относительной плотности нейронов в периинсультной зоне и их гистохимическая типологизация. Для этого у 40 животных (10 – ложнооперированные) в доминантном полушарии в области внутренней капсулы моделировался монополушарный геморрагический инсульт (методику см. выше). Относительная плотность нейронов в периинсультной зоне оценивалась по сравнению с симметричной областью в интактном (контрольном) полушарии (по Masuda T., 2006; Del Bigio M., 1996). Для этого, на окрашенных фронтальных срезах мозга (метод Ниссля, иммуногистохимическое окрашивание) выбирали несколько участков (размером 450x450 мкм), расположенных за скоплением клеток глии, окружающих очаг инсульта. Для каждого участка по пропорции рассчитывался процент погибших нейронов по сравнению с симметричным участком в противоположном интактном полушарии (число нейронов в котором принималось за 100%), полученные значения затем усреднялись (для каждого животного).

Большинство нейронов, локализующихся в стриатокapsулярной зоне – тормозные, ГАМК-эргические. Для типологизации нейронов, находящихся в периинсультной зоне, нами производилось иммуногистохимическое окрашивание серийных срезов мозга (толщина 6 мкм) антителами к ГАМК, кальбиндину D28k, парвальбумину и соматостатину (основным субтипам ГАМК-эргических нейронов) (Chemicon, Temecula, USA).

Плотность определенного субтипа нейронов в прилежащей к гематоме области подсчитывалась также, как и при окраске фронтальных срезов мозга методом Ниссля (см. выше).

Морфологическую картину оцифровывали на морфометрической установке Axoplan 2 (Zeiss, Германия). Затем реконструировали и вычисляли объем инсультного повреждения с использованием программы KS-300 (Zeiss, Германия) и Image-Pro Plus 3.

Полученные поведенческие и морфологические данные были сведены в электронные таблицы Excel, статистический анализ проводили с использованием

программ “Microsoft office Excell 2003” и “Statistica 6.0”. Все значения даны в виде: $m \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. Структурно-функциональная характеристика нейродегенеративных процессов при экспериментальном геморрагическом инсульте.

Операция моделирования геморрагического инсульта осуществлялась стереотаксически путем механического разрушения ткани мозга и локальных кровеносных сосудов в области внутренней капсулы четырьмя-шестью вращательными движениями изогнутого мандрена-ножа, с последующим введением аутокрови животного. Этот метод позволяет наиболее полно экспериментально воспроизвести комплекс патологических процессов, возникающих при геморрагическом инсульте, а также дает возможность осуществить мониторинг процессов компенсации утраченных функций в остром и хроническом периоде. Кроме того, универсальность данного подхода состоит в возможности экспериментального выключения различных структур и отделов мозга.

1.1. Структурные изменения в очаге инсульта

Зона геморрагического инсульта захватывала клеточные образования и территорию не только внутренней капсулы, но и расположенных рядом образований стриатума.

Через 24 часа после операции вокруг очага кровоизлияния идентифицировался выраженный отек. Гематома была окружена валом клеток, в котором различались отдельные клеточные элементы, наблюдались участки скопления интактных и лизированных эритроцитов. В пенумбральной области также идентифицировались дегенерирующие гиперхромные нейроны с трудно различимым ядром.

Через 21 день после операции в области поражения наблюдали образование лакун, очаги скопления олигодендроцитов, астроцитов и микроглии. Также была очевидна большая плотность эндотелиальных клеток, возникшая из-за гиперваскуляризации очага поражения. Наблюдалось расширение кровеносных сосудов.

В области поражения наблюдали ацидофильные нейроны и клетки – "тени". Кроме этого была заметна редукция плотности расположения нейронов в области, прилегающей к очагу поражения, что связано с их дегенерацией. Нами производилась объемная реконструкция очага поражения. В среднем, через 21 день после операции, он составлял $2,04 \pm 0,65 \text{ мм}^3$. Используемая нами модель геморрагического инсульта маленького объема сделала возможным проследить динамику протекающих изменений в максимально короткие сроки.

1.2. Структурные изменения в периинсультной зоне.

Прогресс геморрагического инсульта зависит от характера нейродегенеративных процессов, происходящих в нервной ткани, окружающей инсультный очаг, в зоне пенумбра. В настоящее время вопрос о ее существовании вокруг внутримозговой геморагии остается открытым. В частности, Pascual et al.

(2007), базируясь на данных серийных ЭМРТ снимков больных с геморрагическим инсультом, высказали предположение о том, что развитие патологического процесса вокруг гематомы связано со снижением кровотока в периинсультных областях. В ходе настоящей работы нами была априорно выдвинута и проверена гипотеза о существовании вокруг очага геморрагического инсульта такой зоны пенумбра, в которой возможны дегенерация и гибель нейронов в результате обратимых патологических процессов.

Экспериментальный инсульт в области внутренней капсулы, затрагивал также и некоторые образования стриатума, в частности, globus pallidus и putamen. Для количественной оценки происходящих морфологических изменений мы определяли величину относительной плотности нейронов в прилежащих к гематоме участках этих структур на фронтальных срезах мозга, окрашенных по методу Ниссля. В остром периоде этот коэффициент показывал преимущественно относительное число дегенерирующих (гиперхромных) нейронов (рис. 2).

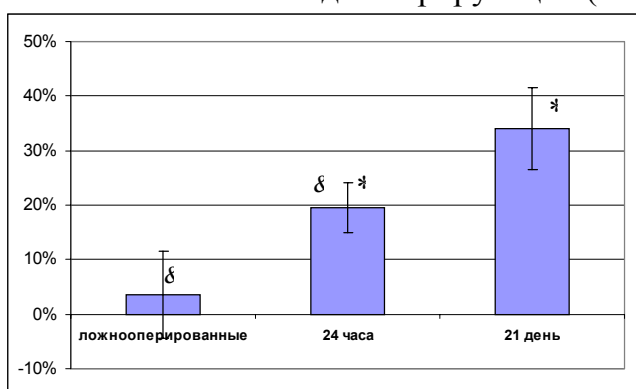


Рисунок 2. Величина относительной плотности нейронов в периинсультной зоне (в %) через 24 часа ($n=10$) и 21 день ($n=15$) после моделирования геморрагического инсульта (&, * $p < 0,05$).

Уменьшение плотности нейронов в периинсультной зоне по сравнению с симметричным участком в интактном полушарии достоверно наблюдалось уже через 24 часа после операции. Этот процесс носил динамический характер: гибель нейронов продолжалась вплоть до 21 дня после операции.

В научной периодике одной из актуальных и спорных проблем является вопрос о существовании отека вокруг очага геморрагического инсульта. Согласно нашим данным, на него можно дать положительный ответ. Следует обратить особое внимание на то, что снижение относительной плотности нейронов в периинсультной зоне наблюдается уже через сутки после его моделирования. В связи с тем, что за это время завершение процесса лизиса структурных элементов нервной ткани практически невозможно, косвенно можно предположить, что такое «разрежение» нервных клеток связано с возникновением вокруг очага инсульта отека основных изменений основного вещества нервной ткани (экстрацеллюлярный отек), что наблюдалось и визуально.

Нами было также отмечено, что в основном нейродегенерация затрагивает нейроны с небольшими клеточными телами (площадь центрального сечения $< 100 \mu\text{m}^2$). Результаты подсчетов представлены на рис. 3.

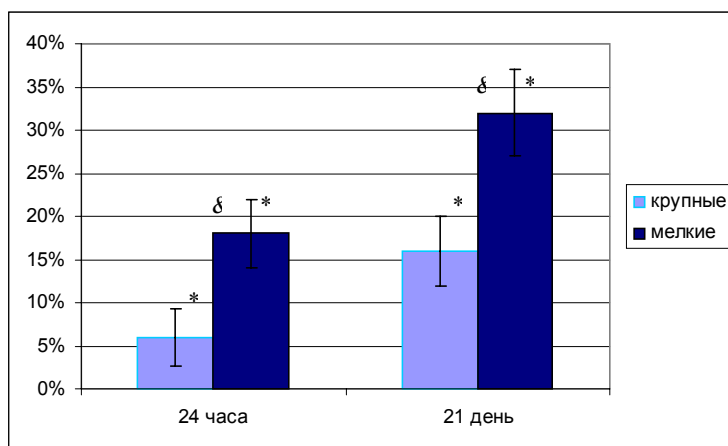


Рисунок 3. Величина относительной плотности нейронов в периинсультной зоне (в %) через 24 часа ($n=10$) и 21 день ($n=15$) после моделирования геморрагического инсульта (площадь центрального сечения крупных $> 100 \mu\text{m}^2$; мелких $< 100 \mu\text{m}^2$) (δ $p < 0,05$; * $p < 0,01$)

Основная масса нейронов, составляющих стриатум, с клеточным телом среднего и малого размера, ГАМК-эргические. По специфическим иммуногистохимическим маркерам они могут быть поделены на несколько субтипов. Выделяют нейроны содержащие калбиндин, парвальбумин и соматостатин. В настоящее время высказываются предположения об отличиях в реактивности разных типов ГАМК-эргических нейронов к патологическим воздействиям. В частности, предполагается, что нервные клетки стриатума новорожденных крысят, содержащие соматостатин, наименее чувствительны к гипоксии/ишемии (Kohlhauser C., 1999). В других исследованиях показано, что в условиях общей гипоксии в стриатуме избирательно уменьшается число калбиндин-иммунореактивных и парвальбумин-иммунореактивных нейронов, а число соматостатин-реактивных нейронов остается неизменным (Luk K., 2001). Следует заметить, что все эти исследования касаются парвальбумин-реактивных нейронов среднего размера, имеющих связи вне стриатума. Динамика изменения числа парвальбумин-иммунореактивных интернейронов малого размера при патологических воздействиях на мозг оставалась неизученной.

Нами была предпринята попытка определения наиболее чувствительных к цереброваскулярной патологии субтипов нейронов с клеточными телами среднего и малого размеров. С этой целью производилось иммуногистохимическое окрашивание фронтальных срезов мозга крыс, у которых моделировался геморрагический инсульт, антителами к кальбиндину D28k, парвальбумину и соматостатину. После этого по пропорции производился подсчет относительной плотности нейронов в периинсультной области по сравнению с симметричным участком в интактном полушарии (количество клеток в котором принималось за 100%) (рис. 4).

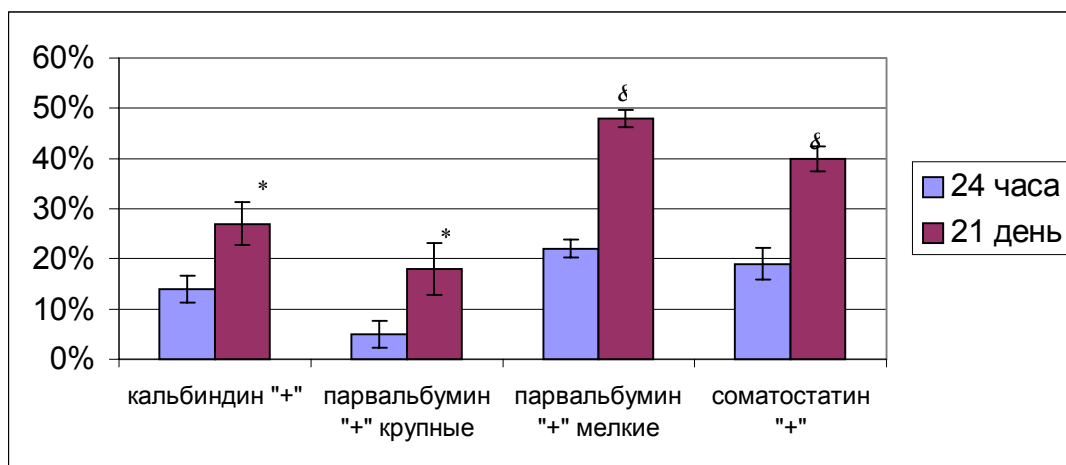


Рисунок 4. Величина относительной плотности различных гистохимических субтипов нервных клеток в периинсультной зоне по сравнению с интактным полушарием, регистрируемая через 24 часа ($n=15$) и 21 день ($n=15$) после моделирования геморрагического инсульта (площадь центрального сечения крупных $> 100 \mu\text{m}^2$; мелких $< 100 \mu\text{m}^2$) (* $p < 0,05$; & $p < 0,01$).

Процесс гибели различных субтипов нейронов в периинсультной области носил динамический характер (развивался к 21 дню после операции). Резистентность нейронов к патологическому воздействию не зависела от их гистохимического субтипа. В частности, парвальбумин-позитивные нейроны разделяют на две группы: отростчатые (с клеточными телами среднего размера) и безотростчатые (с клеточными телами малого размера). Согласно полученным данным, мелкие парвальбумин-позитивные нейроны страдали в большей степени, чем средние.

Область внутренней капсулы в комплексе с другими структурами мозга почти всегда подвергается патологическому воздействию и при моделировании экспериментальной гипоксии/ишемии (окклюзия средней мозговой артерии, перинатальная асфиксия) (He Z., 2000; He Z., 1999; Iizuka H., 1989). Кроме того, известно, что нейроны стриатокapsулярной зоны являются высокочувствительными к гипоксическому/ишемическому воздействию клеточными структурами головного мозга (Schabitz W., 2000; Pulsinelli W., 1982). Несмотря на это, большинство экспериментальных работ по изучению постинсультных дегенеративных процессов проводятся на примере других структур, в частности, полей CA1 и CA3 гиппокампа (из-за удобства количественной оценки). Известно, что мелкие нейроны стриатокapsулярной зоны являются более чувствительными к гипоксическому/ишемическому воздействию клеточными структурами головного мозга (Schabitz W., 2000; Pulsinelli W., 1982). Нами было показано, что наиболее реактивно при экспериментальном геморрагическом инсульте реагируют мелкие нейроны области внутренней капсулы вне зависимости от их гистохимического субтипа.

1.3. Структурные изменения в отдаленных областях мозга

Кроме очага инсульта и прилежащих областей нами также анализировались изменения в отдаленных областях мозга. Внутренняя капсула образована отростками пирамидных нейронов сенсомоторной области коры больших полушарий. Она является своеобразным коллектором, через который проходят связи коры больших полушарий головного мозга с нижележащими структурами. В

связи с этим при локализации гематомы в области внутренней капсулы нарушения двигательной сферы более выражены, чем при поражении соответствующих первичных двигательных зон коры. Нами было выдвинуто предположение о наличии также связи между этими структурами по типу диахизиса (поражение одной приводит к функциональным изменениям в другой).

В связи с этим через 21 день после операции моделирования геморрагического инсульта в области внутренней капсулы нами определялись изменения конфигурации и плотности распределения шипиков, наиболее лабильных при патологических воздействиях структурах клетки, расположенных на апикальных дендритах пирамидных нейронов V слоя сенсомоторной области коры больших полушарий. В частности, подсчитывалась плотность их распределения на 10 $\mu\text{м}$ длины дендрита на расстоянии от 30 до 500 $\mu\text{м}$ от тела клетки.

У крыс с экспериментальным геморрагическим инсультом наблюдалось достоверное снижение (по сравнению с ложнооперированными животными) плотности распределения шипиков (рис. 5), кроме того, они становились более удлинёнными и тонкими.

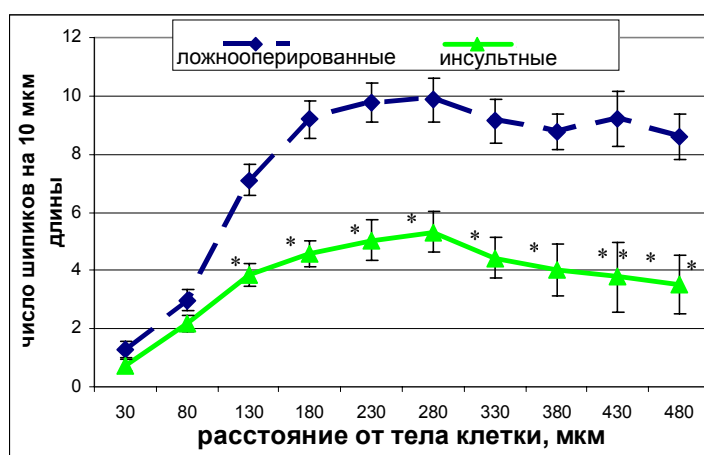


Рисунок 5. Плотность распределения шипиков на 10 $\mu\text{м}$ длины апикальных дендритов пирамидных нейронов V слоя коры больших полушарий у ложнооперированных животных ($n=10$) и животных с экспериментальным геморрагическим инсультом ($n=10$) через 21 день после операции; (* $p<0,01$).

1.4. Изменения поведения животных после моделирования геморрагического инсульта:

Характерной чертой динамики изменения ориентировочно-исследовательской активности интактных животных, определяемой в тесте «открытое поле», с течением времени являлось постепенное уменьшение числа посещенных квадратов и норковых движений и дальнейшая стабилизация этих параметров, начиная с 5-го опыта, на уровне $49\pm 12\%$ и $55\pm 7\%$ соответственно от исходного значения (рис. 6, 7).

Животные с экспериментальным геморрагическим инсультом в раннем послеоперационном периоде были малоподвижными, что выражалось в резком уменьшении всех регистрируемых показателей ориентировочно-исследовательской и двигательной активности в тесте «открытое поле»: количестве посещенных квадратов (уменьшение на $90\pm 7,4\%$), стоек, норковых движений. Затем, через 4-6 дней после операции, наблюдалось нарастание с максимумом на 21 день

ориентировочно-исследовательской и общей двигательной активности («гиперактивность») (рис. 6). Практически во всех случаях летальных исходов у животных перед смертью наблюдалась сильно выраженная гиперактивность.

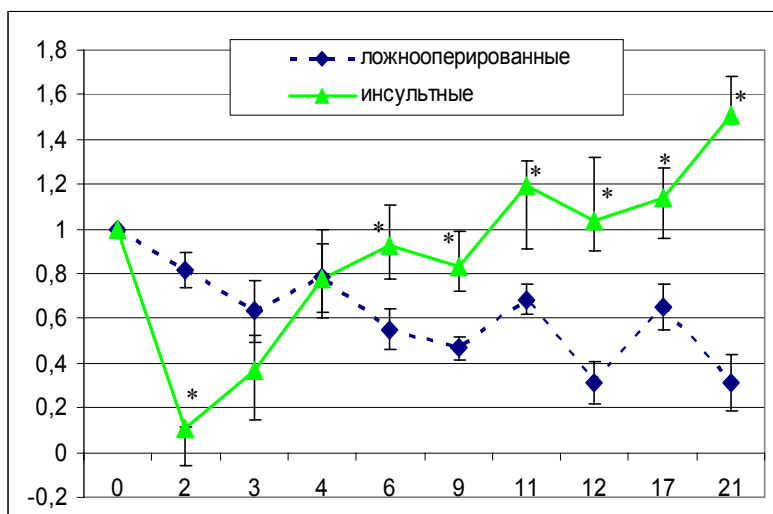


Рисунок 6. Среднее количество квадратов, посещенных в тесте «открытое поле» ложнооперированными животными ($n=31$) и инсультными ($n=30$), нормированное по отношению к дооперационному уровню ($*p<0.05$)

По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт.

По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию число посещенных квадратов

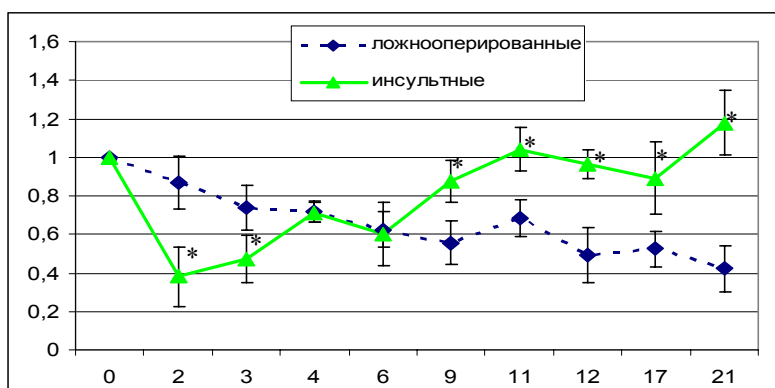


Рисунок 7. Среднее количество норковых движений, совершенных в тесте «открытое поле», ложнооперированными животными ($n=31$) и инсультными ($n=30$), нормированное по отношению к дооперационному уровню ($*p<0.05$)

По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт.

По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию число норковых движений

В тесте на тонкие манипуляционные движения передней конечностью оценивались два показателя. Первый - общее число движений конечностью, совершенных в кормушку. Второй – отношение количества результативных движений ко всему числу движений конечностью (эффективность). Показателем обученности животных являлось достижение показателем эффективности насыщения с небольшими флуктуациями вокруг константной величины.

У ложнооперированных контрольных животных с течением времени число движений в кормушку и эффективность этих движений в послеоперационном периоде оставалась неизменной ($105\pm4\%$ и $96\pm14\%$ соответственно) (рис. 8, 9).

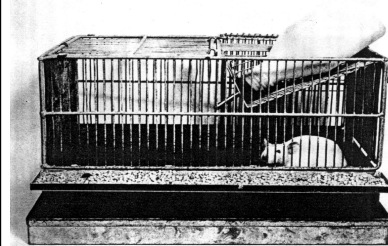
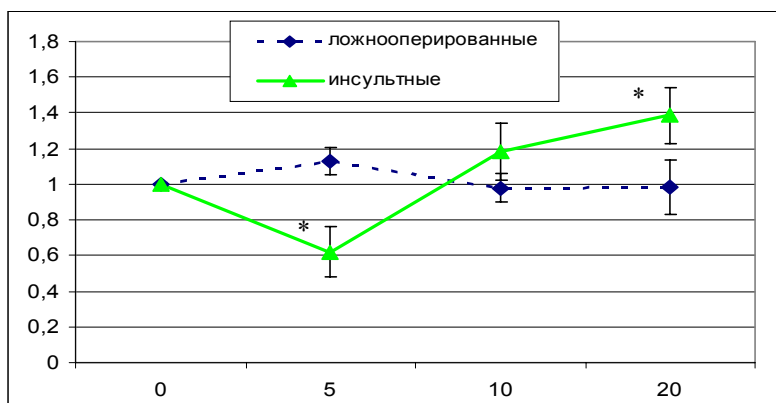


Рисунок 8. Количество тонких манипуляционных движений, совершенных ложнооперированными животными ($n=31$) и инсультными ($n=30$), нормированное по отношению к дооперационному уровню ($*p<0.05$)

По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт.

По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию число тонких манипуляционных движений.

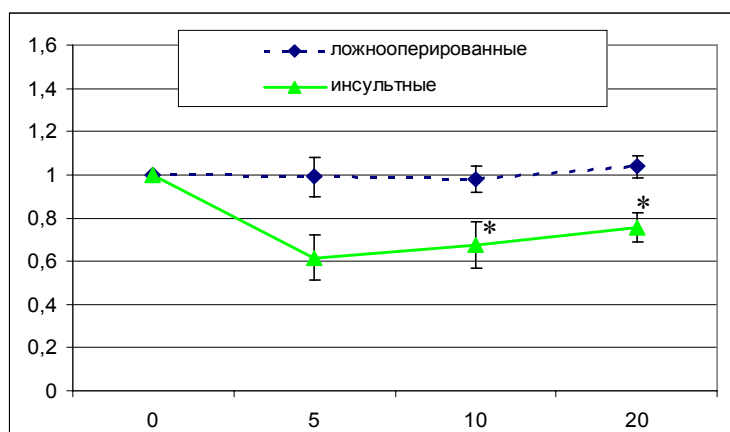


Рисунок 9. Отношение количества результативных манипуляционных движений к общему количеству движений, совершенных ложнооперированными животными ($n=31$) и инсультными ($n=30$), нормированное по отношению к дооперационному уровню ($*p<0.05$).

По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт.

По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию отношение числа результативных манипуляционных движений к общему их количеству.

У животных, у которых моделировался геморрагический инсульт, в послеоперационный период наблюдалось сначала снижение на $38\pm 1\%$, общего числа движений конечностью, а на 29 день после операции увеличение на $39\pm 1,3\%$, этих движений сверх нормы. При этом эффективность манипуляций не восстанавливалась до 21 дня после моделирования геморрагического инсульта.

У ложнооперированных крыс методом пассивного избегания навык торможения вырабатывался к 3-ему предъявлению избегаемого стимула. Этот процесс характеризовался возрастанием латентного времени перехода из светлого отсека экспериментальной камеры в темный, начиная с первого измерения, вплоть до достижения им, на 9 день после операции, максимального значения.

При исследовании динамики выработки рефлекса пассивного избегания у животных, перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, видно, что у них фаза увеличенной двигательной активности (гиперактивность, по данным «открытого поля»), сопровождалась уменьшением длительности латентных

периодов (рис. 10). Можно предположить, что компенсация сниженной двигательной активности у крыс, перенесших геморрагический инсульт, происходила с явным подавлением тормозных процессов.

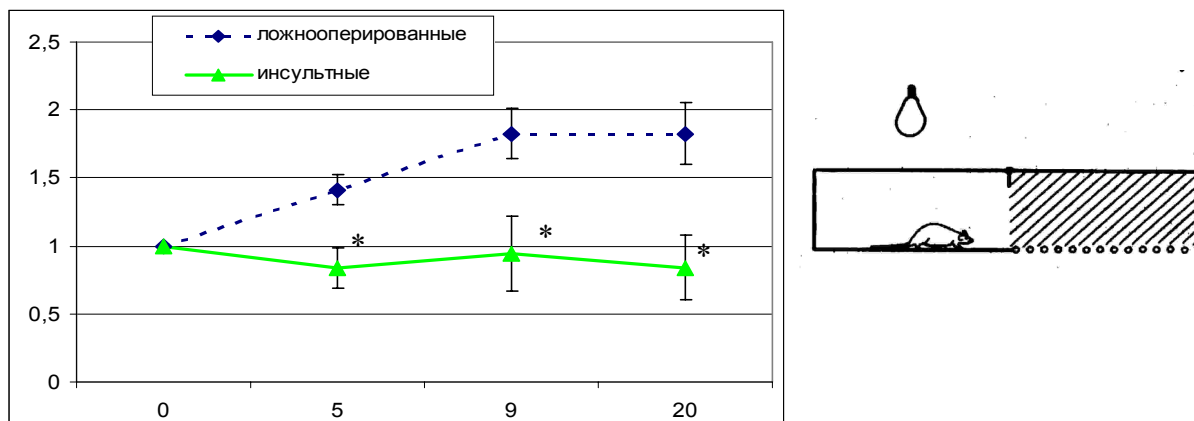


Рисунок 10. Нормированный график величины латентного периода пассивного избегания ложнооперированных животных ($n=31$) и инсультных ($n=30$), нормированное по отношению к дооперационному уровню. По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой моделировался экспериментальный геморрагический инсульт. По оси ординат – величина латентного периода. ($p<0.01$).

Таким образом, функциональные последствия инсультного повреждения в области внутренней капсулы заключались в начальном угнетении ориентировочно-исследовательской и двигательной активности крыс, которая нарастала по 3 неделю включительно и переходила в гиперактивность (тест «открытое поле»), кроме того, отмечалось уменьшение латентного периода условного рефлекса пассивного избегания, что говорит о приобретенном нарушении тормозных процессов. Тонкие манипуляционные движения нарушались и к 3 неделе постинсультного периода полностью не компенсировались.

Можно предположить, что феномен гиперактивности, возникающий у крыс после операции моделирования геморрагического инсульта в области внутренней капсулы связан с гибелью мелких тормозных ГАМК-эргических нейронов, в основном составляющих стриатокapsулярную зону и реорганизацией связей между оставшимися нервными клетками.

Проявление гиперактивности может быть также связано с высокой интенсивностью дегенеративно-регенеративных процессов, протекающих в головном мозге животного после экспериментального воспроизведения геморрагического инсульта. Известно, что повреждение и гибель нейронов, вызываемые инсультом, сопровождаются элиминацией синаптических контактов, что приводит, в частности, к повышенной реактивности постсинаптических элементов к экзогенным возбуждающим факторам.

2. Определение эффективности и специфики нейропротекторного действия вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, а также ее отдельных фракций на модели экспериментальной внутримозговой геморрагии.

В нашей лаборатории было высказано предположение, что в результате геморрагического инсульта в коре больших полушарий головного мозга может происходить выработка ряда факторов, обладающих нейропротекторными свойствами (Батрак Г.Е., 1981). В настоящей работе после операции

моделирования геморрагического инсульта крысам в течение 10 дней внутрибрюшинно и интраназально вводился супернатант гомогената вытяжки из коры головного мозга свиней, успешно перенесших данную цереброваскулярную патологию, также воспроизведенную экспериментально. Специфика противоинсультного действия исследуемой вытяжки определялась по функциональным и структурным показателям в сравнении с ложнооперированными животными, животными, получавшими плацебо (изотонический NaCl) и с животными, получавшими препарат с доказанной эффективностью («Церебролизин»).

2.1. Специфика структурных изменений при введении вытяжки крысам с экспериментальным геморрагическим инсультом.

Объем инсультного очага, регистрируемый на 21 день после моделирования экспериментального геморрагического инсульта, у животных, получавших вытяжку с предположительно противоинсультным действием, были значительно меньше по сравнению с животными, получавшими плацебо, что говорит о ее нейропротекторном действии (рис. 11).

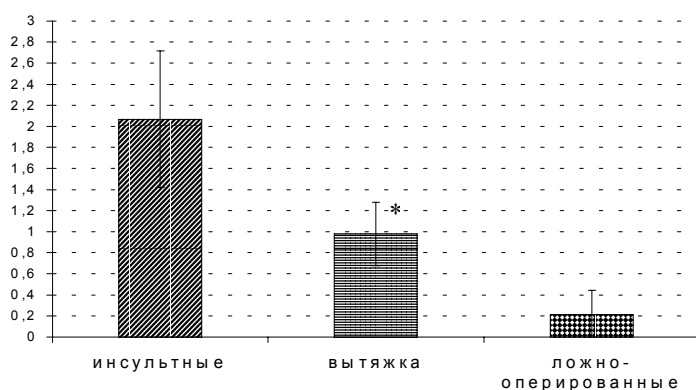


Рисунок 11. Величина среднего объема области инсультного повреждения, регистрируемая на 21 день опыта. Инсультные- контрольная оперированная группа, не получавшая лечения (n= 15), вытяжка - геморрагический инсульт при терапевтическом воздействии вытяжки (n= 15), ложнооперированные – ложнооперированные животные (n=15) (*P<0.01 vs инсультные)
По оси ординат - объем повреждения в мм³

Клиническая выраженность инсульта и особенности реабилитации зависят от степени сохранности нейронов в периинсультной области. Специфика протекторного действия исследуемой вытяжки оценивалась нами по величине относительной плотности мелких (площадь центрального сечения <100 μm²) нервных клеток в периинсультной зоне на фронтальных срезах мозга, окрашенных методом Ниссля.

При подсчете числа нейронов в острый период после моделирования инсульта было обнаружено статистически значимое различие между контрольной группой и группой животных, которым в течение 10 дней вводилась исследуемая вытяжка. Количество дегенерирующих нейронов было больше у животных с экспериментальным геморрагическим инсультом, которые получали плацебо (Рис. 12).

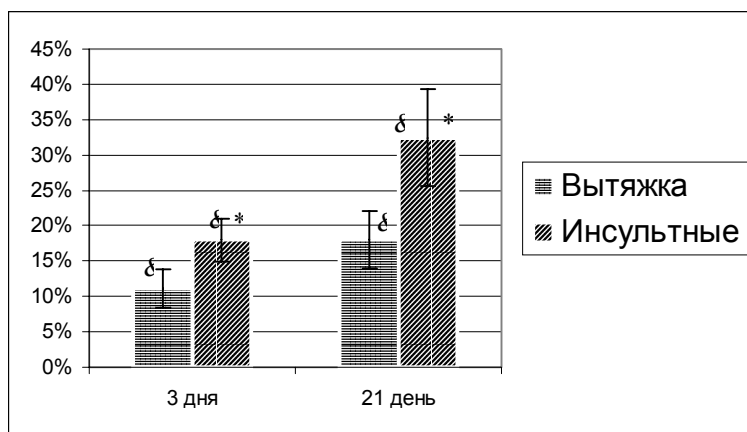


Рисунок 12. Количество погибших в периинсультной зоне мелких (площадь центрального сечения $<100 \mu\text{м}^2$) нейронов (в процентах) на 3 и 21 день после операции у животных, получавших вытяжку из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт (*, & $P<0.01$) ($n=15$) и животных, не получавших лечения ($n=15$)

В нашей работе мы также проводили сравнение степени выраженности нейропротекторного действия вытяжки из коры больших полушарий головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт с фармакологически неактивной фракцией вытяжки и с препаратом с доказанной эффективностью («Церебролизин»). Их нейропротекторная активность также определялась по величине относительной плотности мелких нейронов в периинсультной зоне через 21 день после операции моделирования внутримозговой геморрагии. В результате проведенных экспериментов нами было показано (рис. 13), что ежедневное в течение 10 дней внутрибрюшинное введение вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, обладает более выраженным терапевтическим эффектом, чем введение «Церебролизина» или фракции той же вытяжки, не обладающей нейропротекторными свойствами.

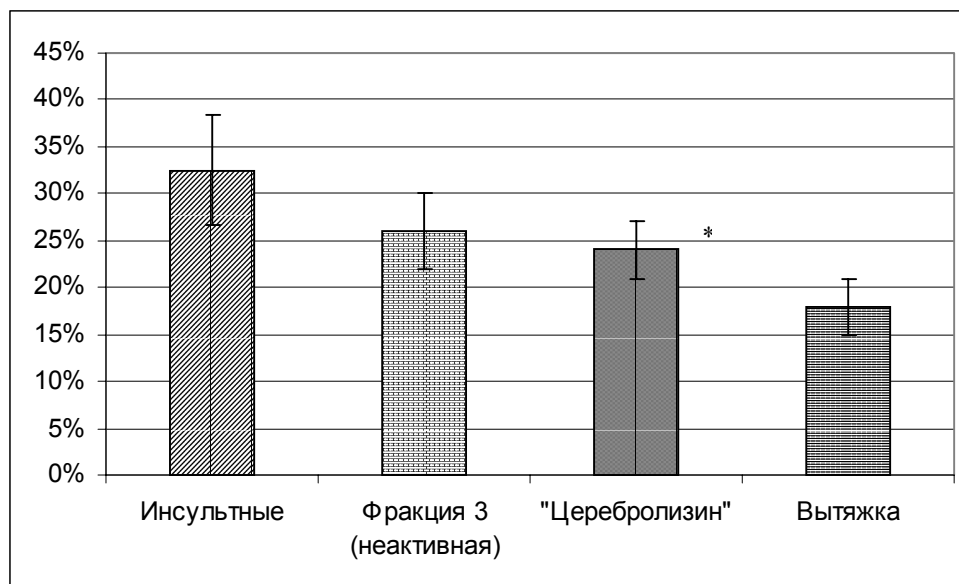


Рисунок 13. Количество погибших в периинсультной зоне мелких (площадь центрального сечения $<100 \mu\text{м}^2$) нейронов (в процентах) на 21 день после операции у животных не получавших лечения (* $P<0.05$) ($n=15$), у животных, получавших фракцию вытяжки, не обладающую нейропротекторной активностью ($n=7$), у животных, получавших препарат «Церебролизин» с доказанной эффективностью ($n=11$), у животных, получавших вытяжку из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт ($n=15$)

Поскольку дендриты и шипики на них – наиболее чувствительные при многих патологических заболеваниях участки нервной клетки, то наиболее важной являлась проверка протекторного действия вытяжки именно на эти структуры.

Ежедневное, в течение 10 дней после операции комбинированное интраназальное и внутривентрикулярное введение супернатанта гомогената вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, стабилизировало плотность распределения шипиков на апикальных дендритах пирамидных нейронов V слоя сенсомоторной области коры больших полушарий головного мозга (рис 14).

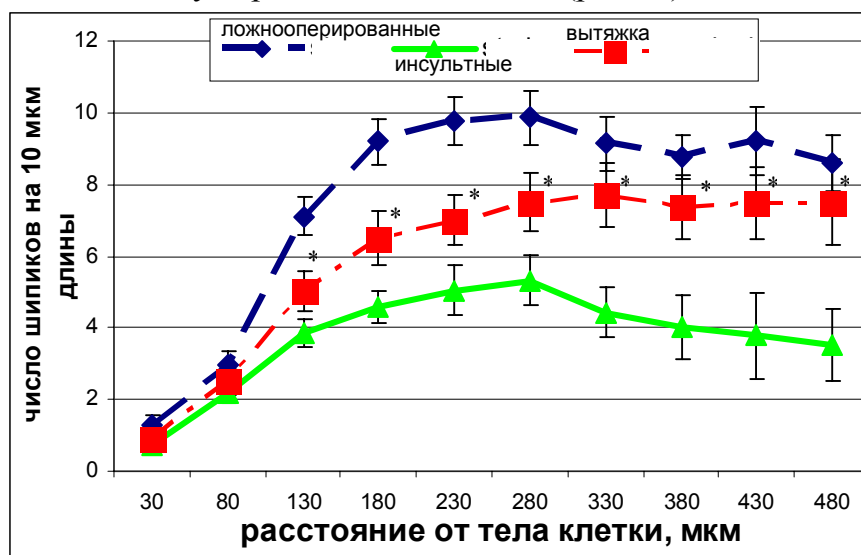


Рисунок 14. Плотность распределения шипиков на 10 мкм длины апикальных дендритов пирамидных нейронов коры головного мозга животных, на 21 день после моделирования геморрагического инсульта у ложнооперированных животных (n= 10), животных с геморрагическим инсультом, получавших плацебо (n= 10), у животных с геморрагическим инсультом, получавших исследуемую вытяжку (n= 7). (* p<0.05 vs инсультные)

Стабилизация плотности распределения шипиков на апикальных дендритах пирамидных нейронов при действии вытяжки может говорить о наличии репаративных пластических перестроек в участках головного мозга, отдаленных от области поражения.

Таким образом, в опытах на белых крысах на модели экспериментального геморрагического инсульта исследована фармакологическая эффективность супернатанта гомогената вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт. По структурным и функциональным показателям было показано выраженное нейропротекторное действие данной вытяжки.

2.2. Функциональные показатели протекторного действия супернатанта гомогената вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт.

Из данных литературы известно, что в экспериментальных исследованиях динамики поведения животных при локализации повреждения в области внутренней капсулы зоны отмечались нарушения двигательной активности, точности движений, повышение тревожности, дефекты долговременной памяти. Однако следует заметить, что динамика этих изменений и ее связь с нарушениями структурной организации пораженных областей мозга остается малоизученной.

В наших исследованиях набор поведенческих методик включал в себя тесты: "открытое поле" (исследование двигательной и ориентировочно-исследовательской активности), на тонкие манипуляционные движения (в котором крыса доставала семечки из кормушки через узко расставленные прутья решетки) и пассивное избегание (тест на сохранность тормозных процессов). Поведенческое тестирование проводили с 21 дня до и с 2 по 28 день после моделирования геморрагического инсульта.

В тесте поворота на наклонной плоскости, ходьбы по бревну, растопыривания пальцев конечностей на гладкой поверхности, по латентности падения из положения виса на турнике вычисляли коэффициент неврологического дефицита по Rosenberg G. (1990), с модификацией.

Неврологический дефицит, возникавший у крыс после моделирования геморрагического инсульта, снижался быстрее у животных, получавших исследуемую вытяжку, по сравнению с животными, получавшими плацебо (рис. 15).

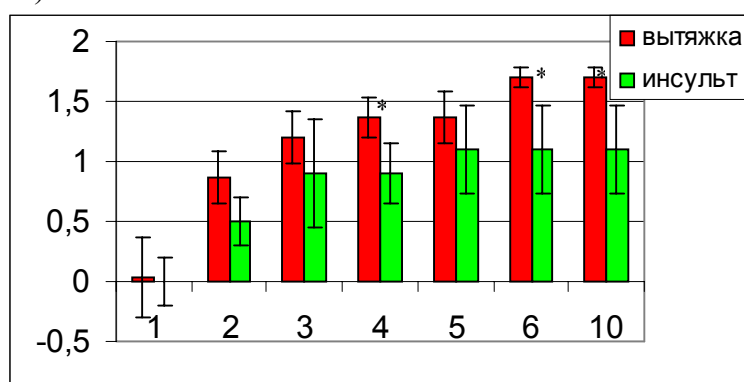


Рисунок 15. Результаты неврологического тестирования животных с инсультом, получавших исследуемую вытяжку ($n = 17$) и животных с инсультом, получавших плацебо ($n = 30$). По оси абсцисс – дни после операции, по оси ординат – средний балл, обратный выраженности нарушений. (* $p < 0.05$)

Вытяжка обладала свойством ускорять процесс компенсации общей двигательной активности, сниженной после воспроизведения экспериментального геморрагического инсульта. При этом общая двигательная активность значительно возрастала в первые дни после операции до 6 дня, а затем к 12 дню достигала предоперационных значений, в отличие от инсультных крыс, получавших плацебо, у которых двигательная активность нарастала вплоть до 21 дня.

Следует отметить, что у животных, получавших исследуемую вытяжку, также наблюдалась гиперактивность. Однако эта гиперактивность (оцениваемая в частности, по числу посещенных квадратов в тесте «открытое поле») достигала максимума уже на 6 день постинсультного периода, а затем нормализовывалась уже к 12-17 дню опыта (рис. 16). Число же “норковых” движений компенсировалось уже к 6 дню (рис. 17).

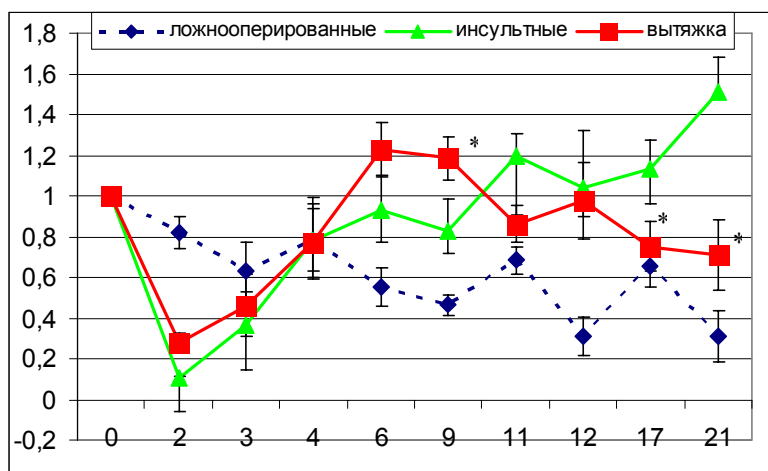


Рисунок 16. Среднее количество квадратов, посещенных в тесте «открытое поле», нормированное по отношению к дооперационному уровню ($*p < 0.05$ vs инсультные) ложнооперированными животными ($n = 31$), инсультными животными, получавшими плацебо ($n = 30$), инсультными животными, получавшими исследуемую вытяжку ($n = 17$)

По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт.

По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию число посещенных квадратов

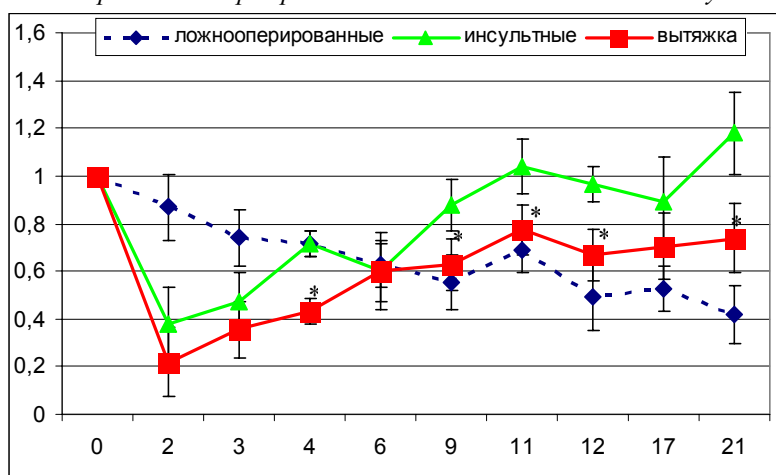


Рисунок 17. Среднее количество норковых движений, совершенных в тесте «открытое поле», нормированное по отношению к дооперационному уровню ($*p < 0.05$ vs инсультные) ложнооперированными животными ($n = 31$), инсультными животными, получавшими плацебо ($n = 30$), инсультными животными, получавшими исследуемую вытяжку ($n = 17$)

По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт.

По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию число норковых движений

Также при введении вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт крысам с моделью данной патологии, происходила компенсация как общего числа движений конечностью, так и эффективности манипуляции к 21 послеоперационному дню ($P < 0,05$) (рис. 18, 19).

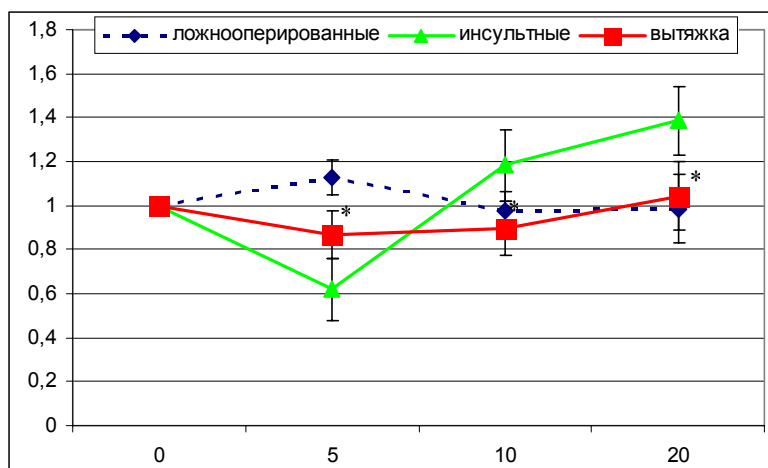


Рисунок 18. Нормированное по отношению к предоперационному уровню количество тонких манипуляционных движений, совершенных ложнооперированными животными ($n=31$), инсультными животными, получавшими плацебо ($n=30$), инсультными животными, получавшими исследуемую вытяжку ($n=17$)

По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт. По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию число тонких манипуляционных движений. ($p<0.05$ vs инсультные).

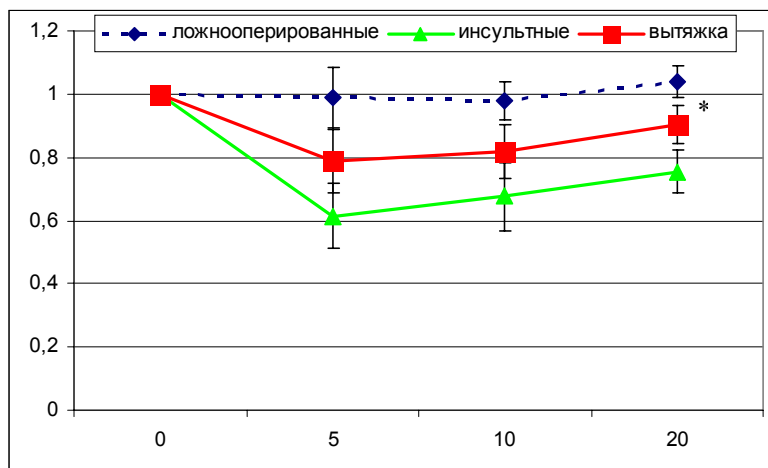
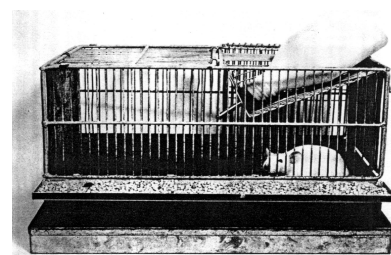


Рисунок 19. Нормированное к предоперационному уровню отношение количества результативных манипуляционных движений к общему количеству движений, совершенными ложнооперированными животными ($n=31$), инсультными животными, получавшими плацебо ($n=30$), инсультными животными, получавшими исследуемую вытяжку ($n=17$)

По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт. По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию отношение числа результативных манипуляционных движений к общему их количеству



Следует обратить особое внимание на постинсультную динамику ориентировочно-исследовательской и двигательной активности в сравнении с динамикой латентного периода условного избегания у животных, получавших исследуемую вытяжку. Видно, что фаза повышенной двигательной активности (в тесте «открытое поле» с 4 по 12 день после операции), которая потом нормализуется и не перерастает в гиперактивность, у таких животных совпадает с динамичным увеличением латентного периода условной реакции пассивного избегания (рис. 20). Таким образом, можно предположить, что в процессе компенсации утраченных оперированными крысами функций, в условиях терапии исследуемой вытяжкой, сбалансированно происходит восстановление как

структур, обеспечивающих возбуждение, так и структур, обеспечивающих общее торможение, нарушенных в результате перенесенного инсульта.

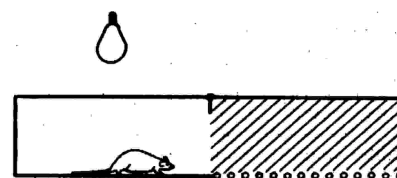
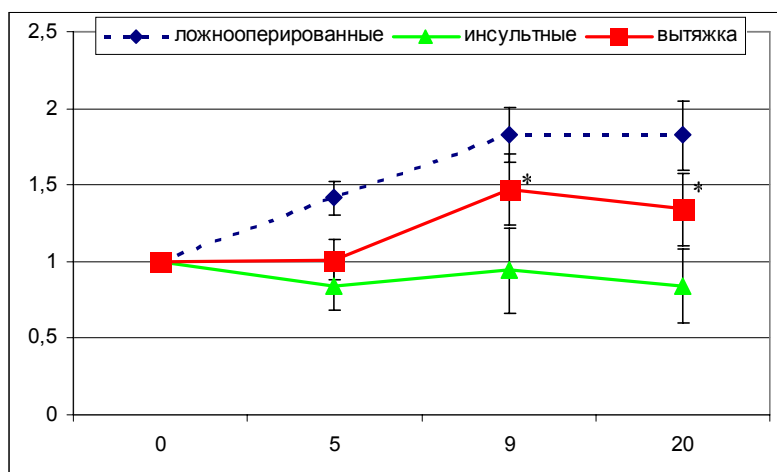


Рисунок 20. Нормированный график величины латентного периода пассивного избегания ложнооперированных животных ($n=31$), инсультных животных, получавшие плацебо ($n=30$), инсультных животных, получавших исследуемую вытяжку ($n=17$). По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой моделировался экспериментальный геморрагический инсульт. По оси ординат – изменения величины латентного периода. ($p<0.05$ vs инсультные)

Следует отметить также, что крысы, получавшие вытяжку из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, более успешно наращивали вес в послеоперационный период (рис. 21).

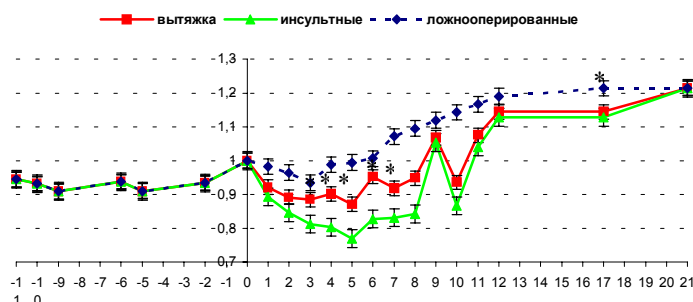


Рисунок 21. Динамика изменения веса ложнооперированных животных ($n=31$), инсультных животных, получавших плацебо ($n=30$), инсультных животных, получавших исследуемую вытяжку ($n=17$). По оси абсцисс – дни до и после операции. По оси ординат – нормированное по отношению ко дню операции значение веса крыс. ($*p<0.05$).

Неравномерность динамики изменения веса у опытных животных объясняется эпизодами пищевой депривации, необходимой для тестирования крыс на сохранность тонких манипуляционных движений.

Элиминация функциональных последствий перенесенного инсульта нередко встречается и в клинической практике. Она может быть связана с функциональным восстановлением нейронов периинсультной зоны, с переобучением или из-за пластичных перестроек нервной ткани. Современные исследования с использованием транскраниальной магнитной стимуляции и функциональной МРТ подтверждают концепцию о нейропластичности, как одном из возможных механизмов компенсации постинсультного двигательного дефицита. В частности, показано, что в результате перенесенного инсульта, затрагивающего первичную

двигательную кору головного мозга, координаты транскраниальной стимуляции, вызывающей приведение кисти, перемещаются в премоторную область. Использование стереотаксических методов выключения отдельных структур головного мозга (в частности, при локальном кровоизлиянии) может также явиться методической базой для экспериментального изучения особенностей пластичных репаративных перестроек (в том числе при лекарственной коррекции нейродегенерации).

Таким образом, при терапевтическом воздействии вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, наблюдалась компенсация сниженной двигательной активности и тонких манипуляционных движений животных к 2-3 неделе постинсультного периода. Особенно следует выделить то, что фаза повышенной двигательной активности у этих крыс протекала на фоне сохранности тормозных процессов, что выражалось в увеличенности латентного периода условного рефлекса пассивного избегания.

3. Действие отдельных фракций вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт.

Нами было показано нейропротекторное действие вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт. Однако точно не известно, какое именно вещество (или вещества), входящие в состав этого поликомпонентного средства, определяют его фармакологическую активность. Стоит задача выделения индивидуального вещества содержащегося в препарате, обладающего противоинсультным действием.

Совместно с группой аналитической химии белка Института биоорганической химии РАН нами была предпринята попытка последовательного разделения исследуемой вытяжки. При этом в экспериментах на белых крысах последовательно выделялась фракция вытяжки, обладающая максимальным противоинсультным действием, которая подвергалась дальнейшему разделению. Было проведено 4 серии таких экспериментов, 4 последовательных фракционирования, и в результате нами была выделена субфракция, по данным хроматографического анализа состоящая из ограниченного числа компонентов, низкомолекулярных пептидов, молекулярной массой < 500 Да.

При дальнейшей попытке разделения нами был отмечен тот факт, что по динамике изменения поведения в тесте «открытое поле» и тесте на сохранность тонких манипуляционных движений, действие различных фракций вытяжки неодинаково.

Например, у животных, получавших фракцию с максимальным антиинсультным действием, как и при действии вытяжки, наблюдалась следующая динамика. Сразу после операции животные были малоподвижными, однако затем развивалась гиперактивность, которая достигала максимума уже на 6 постинсультный день, а затем угасала до нормальных значений уже к 12-17 дню опыта (рис. 22).

У группы животных, получавших другую фракцию вытяжки, ориентировочно-исследовательская активность, определяемая по числу посещенных крысой квадратов в тесте «открытое поле», была ниже и не восстанавливалась вплоть до 21 дня после моделирования геморрагического

инсульта. При этом следует отметить тот факт, что фаза повышенной двигательной активности, гиперактивности, у таких животных отсутствовала.

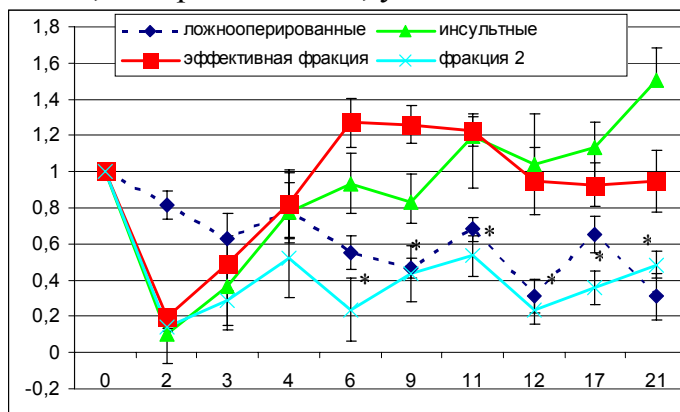


Рисунок 22. Среднее количество квадратов, посещенных в тесте «открытое поле», ложнооперированными животными ($n=31$), инсультными животными, получавшими плацебо ($n=30$), инсультными животными, получавшими разные фракции исследуемой вытяжки ($n=7;8$), нормированное по отношению к дооперационному уровню ($*p<0.05$; активная фракция vs фракция 2)
 По оси абсцисс – дни после операции, в ходе которой у крыс моделировался геморрагический инсульт.
 По оси ординат – нормированное по отношению к начальному тестированию число посещенных квадратов

В тестах на тонкие манипуляционные движения у групп животных, получавших фракции с максимальным антиинсультным действием происходила компенсация как общего количества движений конечностью, так и эффективности манипуляции к 21 послеоперационному дню.

У групп животных, получавших фракции с минимальным антиинсультным действием, показатели были значительно хуже, чем у вышеописанных групп и по динамике были схожими, как и в тесте “открытое поле”.

У остальных групп животных, получавших другие фракции и субфракции препарата, в тестах “открытое поле” и на тонкие манипуляционные движения наблюдались изменения поведенческой активности промежуточного характера, сходные с инсультным контролем или с группами, получавшими фракции, которые усугубляли течение инсультного состояния.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов нами была выделена фракция вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, обладающая максимальным противоинсультным действием, по данным хроматографического анализа состоящая из пяти компонентов. Продолжение данной работы является перспективным исследованием, целью которого может стать получение нового противоинсультного моно вещества.

ВЫВОДЫ

1. При моделировании по разработанной методике геморрагического инсульта в области внутренней капсулы, морфологические изменения заключались в формировании очага инсультного поражения и прогрессирующей гибели нейронов в периинсультной зоне. Устойчивость к дегенерации выше у нейронов с большим диаметром клеточного тела и не зависит от их гистохимического субтипа.
2. В отдаленных областях мозга, связанных с областью поражения, наблюдались нейродегенеративные изменения, которые, в частности, выражались в уменьшении количества шипиков на апикальных дендритах пирамидных нейронов V слоя сенсомоторной зоны коры больших полушарий головного мозга.
3. Функциональные последствия экспериментального геморрагического инсульта в области внутренней капсулы заключались в начальном угнетении ориентировочно-исследовательской и двигательной активности крыс, которая нарастала по 3 неделю включительно и переходила в гиперактивность (тест «открытое поле»). Нарушение тормозных процессов также выражалось в снижении латентного периода условного рефлекса пассивного избегания. Тонкие манипуляционные движения нарушались и к 3 неделе постинсультного периода полностью не восстанавливались.
4. Специфика протекторного действия вытяжки из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, заключается в увеличении резистентности мелких нейронов и в купировании нейродегенеративных процессов в отдельных компонентах нервной клетки (в частности, в дендритических шипиках), что приводило к компенсации сниженной ориентировочно-исследовательской, двигательной активности и тонких манипуляционных движений ко 2-3 неделе постинсультного периода. Особенно следует выделить то, что фаза повышенной двигательной активности у этих крыс протекала на фоне сохранности тормозных процессов, что выражалось в увеличенности латентного периода условного рефлекса пассивного избегания.
5. Показано, что вытяжка из коры головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, обладает выраженным нейропротекторным действием, а ее некоторые фракции и субфракции перспективны для дальнейшего изучения с целью получения нового противоинсультного моно вещества.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Исследования сохранности функции различения сложных зрительных стимулов у крыс после экстирпации идентифицированного участка «Зоны Лешли». Тезисы молодежной научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения академика М.Н. Ливанова. М., 1997. С. 12-13.
2. Феномен локализации высших ассоциативных функций в коре головного мозга крысы («зона Лешли»): функциональная топология,

- цитоархитектонические особенности и внутрикортикальные связи. Материалы конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины». М., 1998. С. 85-86.
3. Методы изучения изменения функции различения сложных зрительных стимулов после экстирпации идентифицированного участка коры больших полушарий головного мозга крыс. Тезисы XVII съезда Всероссийского физиологического общества имени И.П. Павлова. Ростов-на-Дону, 1998. С. 64-65. (Совместно с А.О. Сапецким).
 4. Анализ и синтез сложных зрительных стимулов нормальным и поврежденным мозгом крысы. В сб. "Конференция молодых ученых по проблемам высшей нервной деятельности, посвященная 90-летию со дня рождения чл.-корр. АН и АПН СССР Л.Г. Воронина". М., Изд-во "Российское психологическое общество", 1998. С. 31-32. (Совместно с А.О. Сапецким).
 5. Структурно-функциональные особенности выработки условного рефлекса на сложные зрительные стимулы. Тезисы второй российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии, экспериментальной и клинической медицины». Орел, 2001. С. 61-62.
 6. Experimental hemorrhagic stroke treatment by brain-derived factors in rats. 11th Nordic Meeting on Cerebrovascular Diseases, Kuopio, Finland, 2001, B12, p. 98. (Совместно с А.Н. Макаренко, Н.С. Косицыным, М.М. Свиновым, Н.В. Пасикова).
 7. Коррекция последствий гипоксических состояний факторами, выделенными из коры больших полушарий мозга. Материалы III Всероссийской конференции «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция», Москва, 2002. С. 78. (Совместно с А.Н. Макаренко, Н.С. Косицыным, И.В. Назимовым, М.М. Свиновым).
 8. Модель геморрагического инсульта и выделение пептидных факторов для восстановления структуры и функции мозга. Колосовские чтения – 2002. IV Международная конференция по функциональной нейроморфологии. СПб, 2002. с.52-53. (Совместно с А.Н. Макаренко, Н.С. Косицыным, И.В. Назимовым, М.М. Свиновым).
 9. Коррекция последствий церебрального инсульта факторами, выделенными из коры больших полушарий мозга. Материалы IV Международной конференции по восстановительной медицине (реабилитологии). Москва, 2002. С. 56. (Совместно с А.Н. Макаренко, Н.С. Косицыным, И.В. Назимовым, М.М. Свиновым).
 10. Endogenous brain-derived factors in hemorrhagic stroke treatments. XVth International Congress of Neuropathology. Turin, Italy, 2003. P. 87. (Совместно с А.Н. Макаренко, Н.С. Косицыным, М.М. Свиновым, Н.В. Пасикова).
 11. Исследование антиинсультного действия отдельных фракций вытяжки из коры больших полушарий при экспериментальном геморрагическом инсульте у крыс. XVI зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2004. С. 79.

12. Коррекция ишемического состояния факторами, выделенными из головного мозга животных, перенесших геморрагический инсульт. 3-ий Российский конгресс по патофизиологии. Тез. докл. 2004. Стр.214-215. (Совместно с Н.С. Косицыным, А.Н. Макаренко, И.В. Назимовым, М.М. Свиновым).
13. Структурно-функциональные аспекты терапевтического действия корковых нейротрофических факторов при экспериментальном геморрагическом инсульте. Материалы конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины». М., 2004. С. 107.
14. Структурно-функциональные перестройки в конечном мозге при экспериментальном инсульте. В сборнике "Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга". 2005. Изд. "ИКАР", Стр.149-151. (Совместно с Н.С. Косицыным, М.М. Свиновым).
15. Идентификация новых факторов, оказывающих нейропротекторное действие при коррекции гипоксических состояний головного мозга. IV Российская конференция "Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция". // В кн.: Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. М.:РАМН, ГУ НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН. 2005. С.58-59. (Совместно с Н.С. Косицыным, М.М. Свиновым, А.Н. Макаренко, И.В. Назимовым, О.Ю. Абакумовой, С.В. Божеваловой).
16. Метод экспериментального инсульта как способ исследования структуры и функции мозга в норме и патологии. // Проблемы нейрокибернетики. (Материалы 14-ой Международной конференции по нейрокибернетике, посвященной 60-летию победы советского народа в Великой Отечественной войне и 90-летию Ростовского государственного университета). – Ростов-на-Дону, 2005, т. 2. – с. 251-252. (Совместно с Н.С. Косицыным, М.М. Свиновым, А.Н. Макаренко, С.В. Божеваловой).
17. Сравнительное изучение антиинсультной активности отдельных субфракций средства «Церебрал» в опытах на белых крысах. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2005;68(2):15-20. (Совместно с А.Н. Макаренко, Н.С. Косицыным., И.В. Назимовым, М.М. Свиновым, Н.В. Пасиковой).
18. Характеристика возрастной реакции животных на воздействие лекарственных препаратов с использованием метода корреляционных матриц. В сб. «Общество, государство и медицина для пожилых и инвалидов». М., 2005. С. 122-124. (Совместно с Н.И. Шеиной, Н.Г. Ивановым, Э.Г. Скрыбиной).
19. Эффективность применения пептидов гидролизата мозга при моделировании церебрального геморрагического инсульта. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2006. Т. 69, № 6. С. 27-30. (Совместно с Н.С. Косицыным, М.М. Свиновым, С.В. Божеваловой, А.М. Яблонской).
20. Идентификация и механизм действия новых факторов, оказывающих нейропротекторное действие при коррекции ишемических состояний головного мозга. Материалы международной конференции "Колосовские чтения - 2006". СПб. 2006. С. 35-36.