

Кандидат фармацевтических наук, научный сотрудник Филиала федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино, Россия

ВЛИЯНИЕ ПЕРФТОРАНА НА ПОСЛЕДСТВИЯ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС SHR

Окклюдирующие заболевания крупных магистральных артерий часто являются причиной ишемизации жизненно-важных органов и тканей. В частности окклюзия сонных или базилярных артерий, приводит к глобальной ишемии головного мозга. Известно, что при реперфузии головного мозга после окклюзирующих событий возникают поэтапные нарушения перфузии церебральной ткани: гиперемия и, затем, постишемическая гипоперфузия. Чем длительнее дореперфузионный период, тем выше риск дополнительного реперфузионного повреждения церебральной ткани: оксидантного, обусловленного включением кислорода в свободнорадикальное окисление, и осмотического, вызванного нарастанием цитотоксического отека [5, 6.]. Гемодилюция является одним из наиболее известных и исторических методов увеличения церебральной перфузии. При ишемическом инсульте гемодилюция способствует улучшению мозгового кровотока как в пораженном, так и в контралатеральных полушариях. Перфторан является кровезаменителем с газотранспортной функцией. Показаниями к применению Перфторана являются гиповолемия, нарушения микроциркуляции, противоишемическая защита органов, отключаемых временно от кровотока или предназначенных к трансплантации и т.д. [2]. Как было показано в ряде исследований, [1, 4] он оказывает противоишемическое действие даже в небольших дозах. В плановой терапии Перфторан получил распространение при лечении окклюзии дистальных отделов сосудов нижних конечностей, диабетической ангиопатии, хронических язв желудочно-кишечного тракта, конечностей, гнойных обширных ран, постгипоксических энцефалопатий, в аппаратах для искусственного кровообращения, при гипо- и гипертермии.

Возможность применения Перфторана, как переносчика кислорода к ишемизированным тканям, в качестве агента, частично восстанавливающего энергетический баланс церебральной ткани, определило цель нашего исследования: оценить защитные эффекты Перфторана на последствия ишемии головного мозга у гипертензивных крыс SHR.

Эксперименты были выполнены на бодрствующих самцах гипертензивных крыс SHR (возраст 3-4 месяца). Животные делились на три группы: опытная группа, получающая Перфторан на фоне ишемии (группа Перфторан), n=7; опытная группа, подвергающаяся ишемии, получающая 0,9% NaCl (группа Контроль); n=7; итактные (ложнооперированные) животные (интактная группа), n=6

Животным всех трех групп за сутки до эксперимента имплантировали венозный катетер в яремную вену и окклюдеры на общий ствол правой и левой сонных артерий. Имплантацию катетера и окклюдеров осуществляли под общим наркозом. Через 24 часа на бодрствующих животных 1 и 2 групп проводилась окклюзия сонных артерий путем их пережатия. Одновременно с окклюзией животным из группы Перфторан вводился Перфторан, а контрольной группе – физиологический раствор через катетер, имплантированный в яремную вену в объеме 20% от ОЦК со скоростью 5мл/час. Через 12 минут проводили реперфузию. Ложнооперированные животные не подвергались процедуре окклюзии-реперфузии. Затем животных оставляли на 5 суток в стандартных условиях содержания.

На 6-сутки после окклюзии у животных всех трех групп оценивали основные рефлексы – зрачковый (сужение зрачка в ответ на световой раздражитель), ушной (отдергивание ушной раковины в ответ на прикосновение к ней с внутренней стороны стержнем от ручки), реакция на звук и прикосновение (прикосновение к боку животного), сгибание конечностей и разгибание конечностей. Проявление и выраженность признаков оценивали по бальной системе (от 1 до 5), при этом проявление таких признаков как реакция на свет, ответ на прикосновение, а также сгибание и разгибание конечностей оценивали в 1 балл.

Оценка болевой чувствительности в проводилась с помощью прибора Hot Plate Analgesia Meter (Columbus Instruments, USA). Животные помещались на термостатируемую поверхность прибора нагретого до 55⁰С. Отмечалось латентное время облизывания передних и задних лап, а также латентное время подпрыгиваний.

Анализ локомоторной активности осуществляли с помощью актометра Opto-Varimex ATM3 AutoSystem. При испытании животное помещали в центр и в течении трех минут регистрировалось пройденное расстояние и количество стоек животного.

Уровень тревожности оценивали в тесте «Крестообразный приподнятый лабиринт» - наблюдали за поведением животных на приподнятой установке, состоящей из крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом 4-х рукавов: два противоположных, открытых, без стенок и два закрытых, темных. В течение 5 минут регистрировали время пребывания животных в открытых, закрытых рукавах, а также на центральной площадке, количество заходов в открытые и закрытые рукава [3].

После проведения поведенческих тестов взвешивали и эвтаназировали в CO₂-камере.

Манипуляционное тестирование выявило у контрольных животных значимую разницу в реакции на световой раздражитель (рис.1), в наличии разгибательного рефлекса (рис.2), в визуальном восприятии (рис.3), и в реакции на прикосновение к ушной раковине (рис.4) по сравнению с интактной группой и группой Перфторан. Ослабленный рефлекторный ответ у животных в группе Контроль свидетельствует о том, что периферические нейроны, вовлеченные в тестируемый рефлекс возможно повреждены.

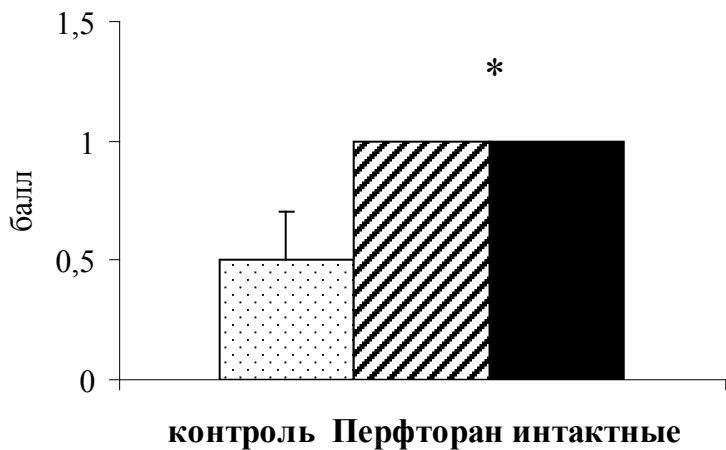


Рис.1. Зрачковый рефлекс

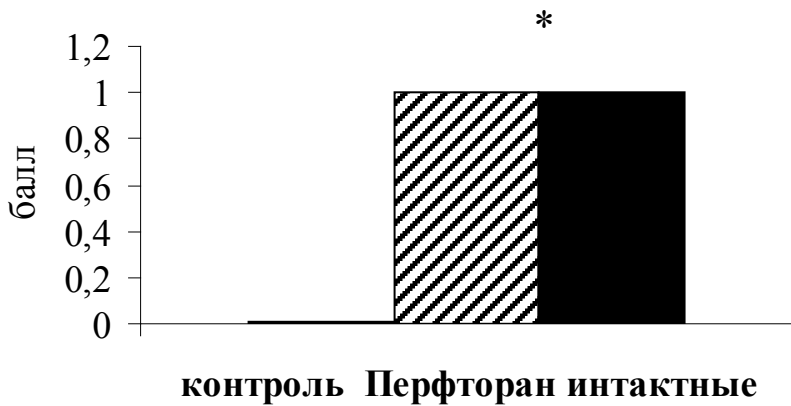


Рис.2. Разгибательный рефлекс



Рис.3. Визуальное восприятие

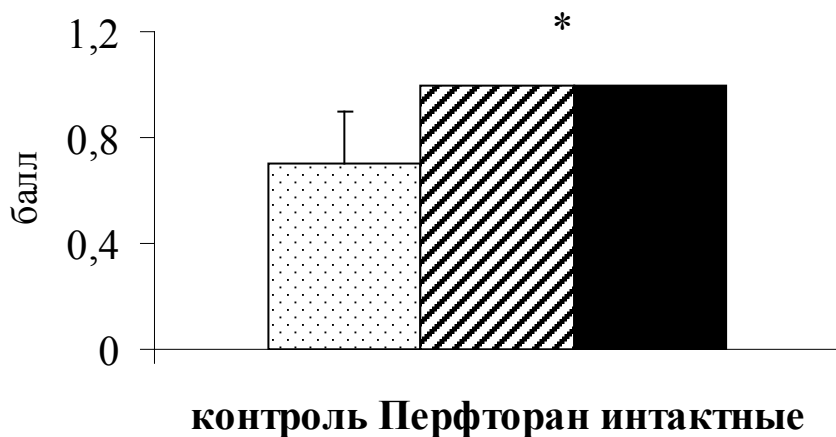


Рис.4. Ушной рефлекс

На рисунках 1,2,3,4 -

* - достоверно значимые отличия показателей относительно контрольной группы по ANOVA-1 ($P < 0.05$).

При оценке других неврологических показателей (реакции на резкий звук, наличии сгибательного рефлекса и ответа на прикосновение к туловищу) не выявилось достоверно различимой разницы в показателях между контрольной группой, группой, получавшей Перфторан и интактными животными.

Локомоторная активность, изученная с помощью автоматического актометра Opto-Varimex ATM3 Autosystem, не выявила различий между показателями у животных всех групп, а лишь определила тенденции к повышенной двигательной активности животных, получавших Перфторан по сравнению с контрольными животными. Локомоторная активность является отражением функционированием комплекса сенсорных модальностей, нервно-мышечных рефлексов и ЦНС. Увеличение двигательной активности животных служит показателем нейропротективного действия Перфторана.

Анализ тревожности в крестовидном приподнятом лабиринте показал увеличение времени груминга в группе Перфторан. Это говорит о повышенном эмоциональном фоне животных по сравнению с контрольной группой и интактными животными (рис.5).

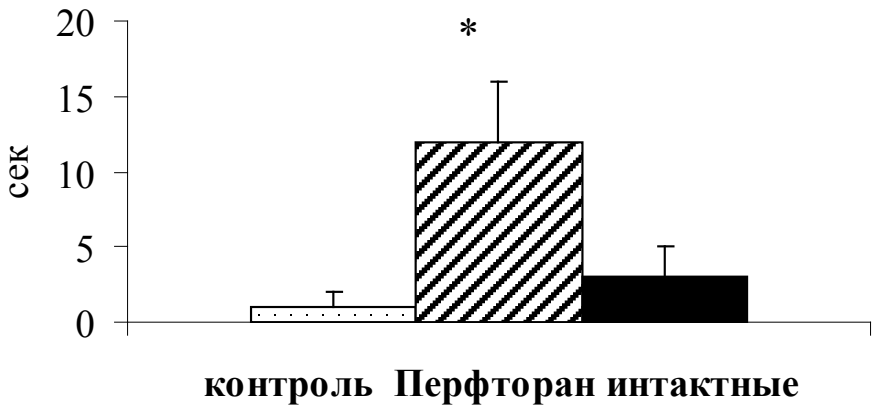


Рис.5. Время груминга в крестовидном приподнятом лабиринте

* - достоверно значимые отличия показателей относительно контрольной группы по ANOVA-1 ($P < 0.05$).

Такие показатели как время пребывания в открытых рукавах и заглядывание вниз во всех групп достоверно не отличались. Но также наблюдалась тенденция к увеличению времени пребывания в открытых рукавах и заглядыванию вниз у животных группы Перфторан, что отражает снижение уровня тревожности.

Анализ болевой чувствительности в тесте Hot Plate выявил увеличение латентного времени облизывания передних лап и подпрыгивания в контрольной группе по сравнению с интактной группой и группой Перфторан (рис.6). То есть Перфторан способствовал сохранности ноцицептивных реакций.



Рис.6. Изменение показателей болевой чувствительности в тесте Hot Plate

* - достоверно значимые отличия показателей относительно контрольной группы по ANOVA-1 ($P < 0.05$).

Перед эвтаназией всех животных взвесили и обнаружили, что потеря массы от исходной животных контрольной группы составила 17%, тогда как дефицит массы в группе Перфторан составил лишь 10% (рис.7). У интактных животных снижение веса не наблюдали.

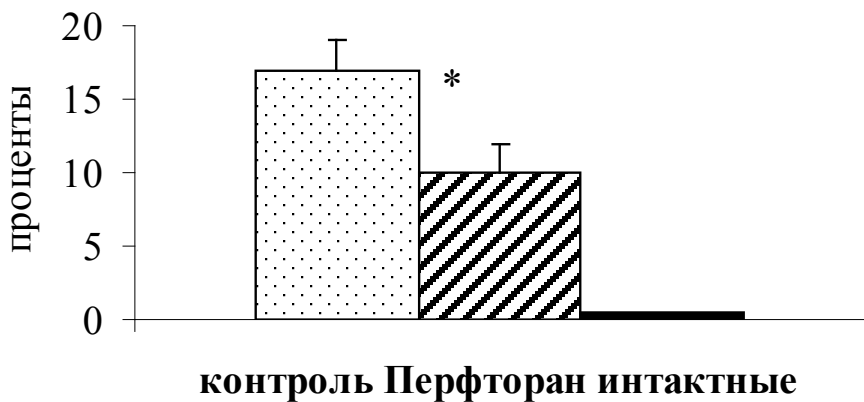


Рис. 7. Потеря в массе от исходной (в %)

* - достоверно значимые отличия показателей относительно контрольной группы по ANOVA-1 ($P < 0.05$).

Влияние Перфторана на морфологию клеток CA1 зоны гиппокампа.

Анализ гистологических срезов, проведенный на 6-сутки после билатеральной окклюзии общих стволов сонных артерий, показал, что Перфторан может сохранять целостность пирамидальных нейронов CA1 зоны гиппокампа. Подтверждением этого явились особенности морфологической картины в группе, получавшей препарат. В сравнении с контрольными животными, у которых нейроны подвергались некрозу с пикнозом ядер и превращением в клетки-тени, воспалительных реакций у животных, получивших Перфторан на фоне ишемии головного мозга, не наблюдалось.

Таким образом, на основании проведенного исследования, можно сделать следующие выводы:

Перфторан, введенный крысам SHR внутривенно в объеме 20% от ОЦК в период острой ишемии головного мозга по истечении 6 суток, оказывает протекторное действие на отделы головного мозга, ответственные за поведение, двигательную активность и увеличивает вероятность сохранения функций головного мозга после ишемической атаки.

Перфторан сохраняет целостность пирамидальных нейронов CA-1 области гиппокампа, наиболее чувствительных к гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев С.И., Ладилев Ю.В., Образцов В.В., Иваницкий Г.Р. Предварительное введение эмульсии перфторуглеродов - новый метод противоишемической защиты миокарда. // Бюлл. эксперимент, биол. и медицины - 1990. - №6. - С.19-21.,
2. Перфторан-кровезаменитель с газотранспортной функцией. Инструкция для врачей клиник. - СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова -Санкт-Петербург, 2001
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. -М., 2000)
4. Kolluri S., Heros R.C., Hedley-Whyte E.T., Vonsattel J.P., Miller D., Zervas N.T. Effect of Fluosol on oxygen availability, regional cerebral blood flow, and infarct size in a model of temporary focal cerebral ischemia// Stroke.- 1986 Sep-Oct;- V.17(5).- P.976-1180.
5. Kidwell C.S., Saver J.C., Mattiello J et al.// Neurology.- 1999.-P.52-53.,
6. Li F, Tatlisumak T. et al. //Ann Neurol .-1999.-V.46.-P.333-342.

