

УДК 615.21

# НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НООПЕПТА НА МОДЕЛИ ФОКАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА

*В.Н. Ракитский, С.С. Пашин*

ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана», Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 141014, Московская обл., г. Мытищи, Российская Федерация

**Ц**ель исследования – морфофункциональная оценка нейропротекторного действия ноопепта на экспериментальной модели фокального ишемического повреждения грудного отдела спинного мозга. Результатами патоморфологических и поведенческих исследований установлен нейропротекторный эффект ноопепта после фокального фотоиндуцированного тромбоза кровеносных сосудов грудного отдела спинного мозга крыс.

**Ключевые слова:** спинной мозг, нейроны, ишемия, фотохимическое повреждение, ноопепт.

**Введение.** Основными патогенетическими звеньями ишемического повреждения структур центральной нервной системы являются: гиперактивация рецепторов возбуждающих аминокислот (глутаматная нейротоксичность), накопление избыточного внутриклеточного кальция, активация перекисного окисления липидов. В последние годы получены доказательства эффективности ноопепта в отношении этих звеньев. Ноопепт снижал количество погибших нейронов в культурах клеток мозжечка, подвергшихся действию токсических доз глутамата [1], блокировал потенциал-зависимые кальциевые каналы изолированных нейронов [5], предотвращал выраженные нарушения перекисного окисления липидов, вызванные иммобилизационным стрессом [4]. Все это позволяет предполагать эффективность данного препарата для фармакологической коррекции ишемических повреждений спинного мозга.

**Цель работы:** морфофункциональная оценка нейропротекторного действия ноопепта на экспериментальной модели фокального ишемического повреждения грудного отдела спинного мозга.

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена на 200 крысах-самцах линии Вистар, массой 150 – 250 г в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспери-

ментальных животных» и Приказом Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г № 708н « Об утверждении правил лабораторной практики». Наркотизацию крыс осуществляли интраперитонеальным введением хлоралгидрата в дозе 350 мг/кг. Перед операцией наркотизированным крысам для адгезии эритроцитов к стенкам сосудов вводили в яремную вену 3% раствор красителя бенгальского розового (Sigma, США R 4507) в дозе 40 мг/кг. Крыс фиксировали в стереотаксической установке (Медикор, Россия). Кожу спины выбривали и обрабатывали 2% раствором йода. После срединного продольного разреза кожи отсепаровывали позвоночник. Для воспроизведения фотоиндуцированного тромбоза использовали оригинальную установку, состоящую из галогеновой лампы (24 В, 250 Вт) и отходящих от нее двух световодов диаметром 3 мм [2]. Световоды помещали над поверхностью грудного отдела позвоночника на расстоянии 1-2 мм. Длительность световой экспозиции составляла 30 мин. Для предупреждения термокоагуляционного эффекта поверхность позвоночника во время экспозиции постоянно орошали охлажденным изотоническим раствором. Затем рану обрабатывали и зашивали.

Животным контрольной группы производили операции по той же схеме, но краситель не вводили.

**Ракитский Валерий Николаевич (Rakitskii Valerii Nikolaevich)**, д.м.н., профессор, академик РАН, и.о. директора ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская обл., г. Мытищи, Российская Федерация, pestidci@yandex.ru

**Пашин Сергей Сергеевич (Pashin Sergei Sergeevich)**, младший научный сотрудник отдела токсикологии и гигиены окружающей среды ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская обл., г. Мытищи, Российская Федерация, ser46539381@yandex.ru

Ноопепт вводили внутривенно экспериментальной (опыт 2) группе животных (фотоиндуцированный тромбоз) в интервале между 1-ым и 9-ым днем после операции в дозе 0,5 мг/кг/день.

Для нейростологического исследования наркотизированных животных транскардиально перфузировали смесью формалин-спирт-уксусная кислота в пропорции 2:7:1. Спинной мозг извлекали через 4-5 час, фиксировали дополнительно в течение 1 часа и обезвоживали изопропанолом возрастающей концентрации [3]. Парафиновые срезы изготавливали по стандартной методике, депарафинировали и окрашивали крезильным фиолетовым прочным по методу Ниссля; люксолевым прочным синим и крезильным фиолетовым прочным по модифицированному методу Клювера-Баррера для выявления миелиновых волокон и клеток мозга. Для выявления ишемического поврежденных нейронов использовали ванадиевый кислый фуксин [6].

Для оценки моторных функций использовали разработанный нами метод нарушения произвольных, врожденных реакций (рефлексы сгибания, хватания, переворачивания, реакция постановки лапы на опору и др.).

Количественную оценку состояния и поведения животных проводили по интегральному показателю, критериями для которого служили несколько параметров состояния животных, регистрируемых в ходе исследований. Каждому критерию был присвоен определенный балл (табл. 1).

**Результаты и обсуждение.** Общая картина поведенческих реакций крыс после моделирования

фотоиндуцированного тромбоза с использованием ноопепта (опыт 2) была сходной с тем, что наблюдалось после аналогичного воздействия без использования нейропротектора (опыт 1). Однако выявленные у крыс патологические изменения носили менее выраженный характер, а восстановление функций происходило почти в два раза быстрее. В таблице 2 представлена динамика изменений поведения животных группы «опыт 2» в сравнении с группой «опыт 1» и контролем. Как следует из таблицы, на шестые сутки последствие приходился пик изменения поведенческих показателей в группе «опыт 2», но их количественная характеристика в среднем примерно в три раза выше, чем у животных группы «опыт 1», хотя можно констатировать лишь тенденцию к различию этого показателя (различия статистически недостоверны).

На 12-е сутки восстановительного периода повышение интегрального показателя у группы «опыт 2» становится статистически значимым по отношению к группе «опыт 1» и приближается к контролю. Спустя еще две недели данный показатель практически не отличается от контроля и фона.

Ноопепт уменьшал степень угашения моторных функций, снижал летальность. При этом ткань спинного мозга в очаге ишемического повреждения оставалась более сохранной, чем у контрольной группы животных (рис.1).

Анализ гистологических препаратов показал, что количество ацидофильных и гиперхромных нейронов в очаге ишемического повреждения и в перифокальной зоне достоверно меньше

Таблица 1

### Шкала оценки поведенческих реакций у крыс по интегральному показателю в баллах

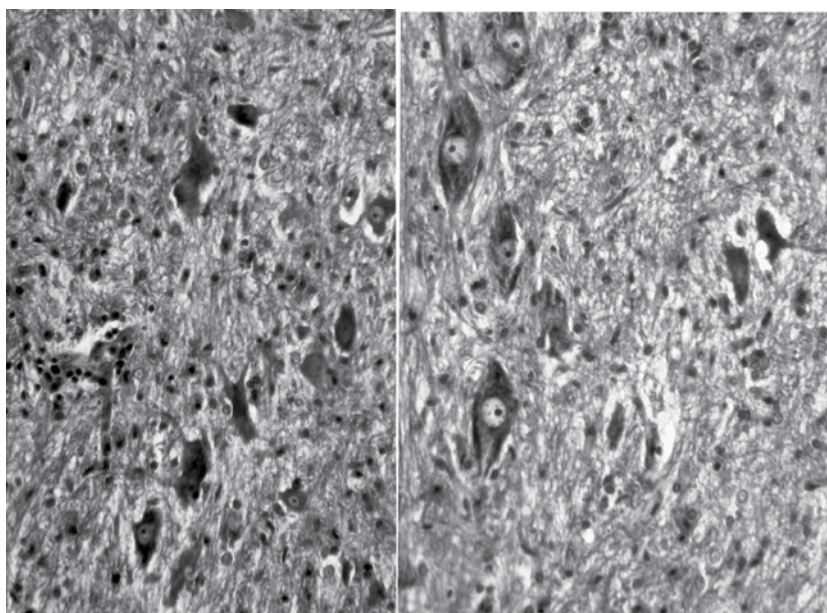
Критерии оценки	Балл
Отсутствие двигательной активности и рефлекса позы	0
Отсутствие двигательной активности и реакции на раздражитель задних конечностей и хвоста, но сохранение рефлекса позы	1
Двигательная активность только за счет передних конечностей, слабая реакция на раздражитель задних конечностей и хвоста	2
Имитация восстановления функций одной из задних конечностей	3
Имитация восстановления функций обеих конечностей	4
Восстановление функций задних конечностей, но сниженная реакция на тепловой раздражитель (более 8 сек)	5
Восстановление скорости реакции на тепловой раздражитель (8 сек и менее)	6

Таблица 2

**Динамика изменений интегрального показателя поведенческих реакций крыс до (фон) и после операции по моделированию фотоиндуцированного тромбоза спинного мозга без использования (опыт 1) и с использованием (опыт 2) ноопепта (средние данные)**

Группы животных	фон	Время после воздействия					
		1 сут.	6 сут.	12 сут.	24 сут.	48 сут.	68 сут.
Контроль	5,8±0,4	4,4±0,5	5,5±0,5	5,8±0,4	5,8±0,4	5,7±0,5	5,8±0,4
Опыт 1	5,6±0,5	4,1±0,6	0,8±0,6	1,7±0,5	2,9±0,6	4,2±0,9	5,0±0,7
Опыт 2	5,6±0,5	4,4±0,7	2,7±0,7	4,1±0,7*	5,1±0,7	5,5±0,5	5,7±0,5

**Примечание:** знаком «\*» отмечены статистически значимые изменения ( $p < 0,05$ )



**Рис. 1.** Ишемическое повреждение нейронов (фотоиндуцированный тромбоз, фотоиндуцированный тромбоз + нейропротекторный эффект ноопепта). Окраска Люксолевым прочным синим с докрасиванием крезильовым фиолетовым прочным. Увеличение 20X

у животных, которым вводился нейропротектор. Полученные данные свидетельствуют о том, что ГВС-111 препятствует постишемическим деструктивным процессам в фокальном ишемическом очаге, индуцированном фототромбозом.

При этом наблюдается достаточно стабильная корреляция между нормализацией поведенческих реакций и сохранностью нейронов в зоне ишемического поражения (табл. 3).

Как следует из таблицы 3, на шестые сутки после экспозиции относительное количество неповрежденных нейронов перифокальной области

у животных, которым вводился нейропротектор, было значительно выше суммарного относительного количества нормальных и обратимо измененных нейронов у животных, не получавших нейропротектор.

**Заключение.** Результаты проведенных исследований не позволяют установить, на какие механизмы клеточной патологии влияет ноопепт, но обнаруженный нейропротекторный эффект препарата делает его перспективным для разработки методов коррекции постишемических нарушений в структурах спинного мозга

Таблица 3

**Количество клеток (в %) в перифокальной зоне с различной степенью повреждения после фотоиндуцированного тромбоза у крыс групп «опыт 1» (не вводился нейропротектор) и «опыт 2» (вводился нейропротектор)**

Степень повреждения клеток	Группы животных	Сроки наблюдения после экспозиции		
		1 сут.	6 сут.	60 сут.
Без изменений	Опыт 1	84,2±3,3	11,8±1,3	30,0±1,8
	Опыт 2	87,2±2,8	44,1±3,1	72,9±3,0
Обратимые изменения	Опыт 1	8,1±1,7	22,5±1,6	28,7±1,7
	Опыт 2	8,4±1,6	37,3±2,8	15,1±1,9
Необратимые изменения	Опыт 1	7,7±2,5	65,7±1,4	41,3±3,0
	Опыт 2	5,2±2,0	18,6±2,8	12,0±1,8

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. Нейропротективные эффекты ноотропного дипептида GVS-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе in vitro. // Бюл. Эксперим. биол. и мед. - 2000.  
2. Викторов И.В., Барсков И.В. Методика окрашивания ишемических

нейронов головного и спинного мозга. // Патол. физиол. и эксперим. терапия. - 1993. - № 2. - С. 53.  
3. Викторов И.В., Пашин С.С. Применение изопропилового спирта в гистологических методах: обезвоживание и заливка ткани в парафин, обработка парафиновых срезов. Бюл. экспер. биол. мед., 2003, № 7, 119-120.  
4. Лысенко А.В., Ускова

Н.И., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А. Дипептидный ноотроп GVS-111 предотвращает накопление продуктов перекисного окисления липидов при иммобилизации. // Эксперим. и клин. фармакол. - 1997. - Т. 60. - № 5. - С. 15-18.  
5. Solntseva E.I., Bukanova J., Ostrovskaya R. et al. The effects of piracetam and its novel peptide

analogue GVS-111 on neuronal voltage-gated calcium and potassium channels. // Gen. Pharmacol. - 1997. - V.29. - P. 85-89.  
6. Victorov I.V., Prass K., Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. // Brain Res. Protocols. - 2000. - V. 5. - P. 135-139.

## REFERENCES:

1. Andreeva N. A., Stelmashuk E. V., Isaev N. K., Ostrovskaya R. U., Gudashcheva T. A., Viktorov I. V. Neuroprotective effects of nootropic dipeptide GVS-111 in the conditions of oxygen-glucose deprivation, glutamate toxicity and oxidative stress in vitro. Bull. of Experim. Biol. and Med. 2000. (in Russian)  
2. Viktorov I. V., Barskov I. V. Methodology for staining of ischemic

neurons of brain and spinal cord. Pathol. Physiol. and Experim. Therapy. 1993. №2, p. 53. (in Russian)  
3. Viktorov I. V. & Pashin S. S. Application of isopropyl alcohol in histological methods: dehydration and embedment of tissues in paraffin, treatment of paraffin-embedded sections. Bull. of Exper. Biol., 2003, t. 136, №7, p. 119-120. (in Russian)

4. Lisenko A. V., Uskova N. I., Ostrovskaya, R. U., Gudashcheva T. A., Voronina T. A., Dipeptide nootropic agent GVS-111 prevents accumulation of products of lipid peroxyoxidation during immobilization. Experim. and Clinic. Pharm. 1997. T. 60. № 5, p. 15-18. (in Russian)  
5. Solntseva E.I., Bukanova J., Ostrovskaya R. et al. The effects

of piracetam and its novel peptide analogue GVS-111 on neuronal voltage-gated calcium and potassium channels. // Gen. Pharmacol. - 1997. - V.29. - P. 85-89.  
6. Victorov I.V., Prass K., Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. // Brain Res. Protocols. - 2000. - V. 5. - P. 135-139.

V.N. Rakitskii, S. S. Pashin

## NEUROPROTECTIVE EFFECT OF NOOPEPT SHOWN IN A MODEL OF FOCAL ISCHEMIC DAMAGE TO THE SPINAL CORD

F.F.Erisman Federal Scientific Center of Hygiene, Federal Service for Surveillance on. Consumer Rights Protection and Human Well-being, 141014, Mytishchi, Russian Federation

The aim of the study was a morphofunctional evaluation of the noopept neuroprotective effect in an experimental model of focal ischemic injury to the spinal cord thoracic segment. The results of the pathomorphological and behavioral studies proved the neuroprotective effect of noopept after focal photo-induced thrombosis in blood vessels of the spinal cord thoracic segment in rats.

**Keywords:** spinal cord, neurons, ischemia, photochemical damage, noopept.

Материал поступил в редакцию 23.12.2015 г.