

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

СТРЕССПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИТОФЛАВИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА КРЫС

В. Н. Крылов¹, А. В. Дерюгина¹, Е. А. Антипенко²

Проведен анализ стресс-реализующих реакций крови (электрофоретическая подвижность эритроцитов, лейкоцитарная формула и лейкоцитарный коэффициент) крыс с экспериментальной ишемией головного мозга при действии цитофлавина. Установлено, что цитофлавин в комплексе с базовой терапией приводит к дополнительной активации компенсаторно-приспособительных реакций организма, стимулируя периферические стресс-лимитирующие механизмы.

Ключевые слова: цитофлавин; хроническая ишемия мозга; компенсаторно-приспособительные реакции; стресспротекторное действие.

ВВЕДЕНИЕ

Сосудистые поражения головного мозга стали одной из ведущих проблем клинической неврологии. Патогенетической основой ишемических повреждений головного мозга является гипоксия [3, 11, 13]. Вместе с тем известно, что гипоксия ткани головного мозга при хронической ишемии может рассматриваться как стрессорный фактор [12]. При этом длительное действие стресс-фактора, в частности, хроническая ишемия головного мозга, может вызывать развитие адаптационного процесса в организме, который при благоприятном течении приводит к развитию адаптации, при неблагоприятном течении — дезадаптации [8]. Поэтому представляется целесообразным исследование адаптационных возможностей организма при применении препаратов, влияющих на уровень адаптационного резерва и активирующих стресс-реализующие механизмы на фоне длительного воздействия стресс-фактора, которым выступает гипоксия ткани головного мозга при хронической ишемии. В последнее время для неспецифической цитопротекторной терапии широко применяется антиоксидант цитофлавин (ООО НТФФ «ПОЛИСАН», Россия) [1, 4, 10, 14, 15]. Цитофлавин является сбалансированным комплексом из 2 метаболитов (янтарная кислота, рибоксин) и 2 коферментов витаминов (рибофлавин мононуклеотид — витамин В₂, никотинамид — витамин РР). Таким образом, все компоненты цитофлавина представляют естественные метаболиты организма, которые утилизируются клеточными структурами, участвуют в окисли-

тельно-восстановительных реакциях, способствуют снижению интенсивности перекисного окисления липидов, активации системы антиоксидантной защиты, что приводит к нормализации обменных процессов в организме. Однако стресспротекторное действие цитофлавина при ишемии головного мозга изучено недостаточно. Ранее нами было показано, что электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) и лейкоцитарная формула (ЛФ) являются значимым маркером в диагностике адаптационных процессов организма при хронической ишемии головного мозга [5]. При этом ЭФПЭ характеризует степень вовлечения стресс-реализующих систем [7], а ЛФ позволяет оценить общие неспецифические адаптационные реакции (ОНАР) организма [2].

Целью работы явилось исследование адаптационных реакций крови крыс с экспериментальной локальной ишемией головного мозга при включении в комплекс стресс-модулирующей терапии цитофлавина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 60 половозрелых крысах (самцы) линии Вистар массой 250 – 300 г (питомник Крюково). Содержание и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”. В ходе экспериментов животные были разделены на 3 группы по 20 крыс (интактные, контроль — базовая терапия, опыт — базовая терапия плюс цитофлавин). У животных моделировали ишемию головного мозга [16, 17]. Локальную ишемию вызывали необратимой окклюзией левой ветви средней мозговой артерии и подходящей к ней вены с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии. Окклюзия достигалась путем электрокоагуляции аппаратом электрохирургическим высокочастотным ФОТЕК Е81.

¹ Институт биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского, Россия, 603950, ГСП-20, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

² Нижегородская государственная медицинская академия, Россия, 603950, ГСП-470, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1.

Работу проводили под нембуталовым наркозом (внутрибрюшинно, 35 мг/кг). После операции рану обрабатывали сухой калийной солью пенициллина, кожу ушивали, шов обрабатывали 2 % раствором йода.

Через 10 дней после создания искусственной ишемии головного мозга животным контрольной группы (базовая терапия) внутрибрюшинно вводили пирарцетам в дозе 200 мг/кг и винпоцетин (0,7 мг/кг). Крысам опытной группы вместе с пирарцетамом и винпоцетином внутрибрюшинно вводили цитофлавин в дозе 0,16 мл/кг. Повторное введение препаратов осуществляли ежедневно в течение последующих 9 сут ишемии головного мозга. Забор крови у животных производили из подязычной вены в объеме 0,5 мл через 10 и 60 сут после моделирования ишемии. ЭФПЭ измеряли методом микроэлектрофореза по ранее описанной нами методике [6]. Подсчет ЛФ проводили по общепринятой методике, с учетом рекомендации Л. Х. Гаркави определяли лейкоцитарный коэффициент (ЛК) — соотношение лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов и тип ОНАР — по процентному содержанию лимфоцитов [2]. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах на крысах было установлено, что при моделировании локальной ишемии головного мозга у животных на 10 сут наблюдалось снижение ЭФПЭ, по сравнению с интактными животными (табл. 1). Анализ изменения ЛК в опытной и контрольной

группах также показал его снижение к 10 сут ишемии с $(3,5 \pm 0,4)$ до $(2,1 \pm 0,4)$ у. е. ($p < 0,05$).

При исследовании ЛФ у животных с локальной ишемией регистрировали рост числа сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов и уменьшение количества лимфоцитов и моноцитов относительно показателей интактных крыс (табл. 2). Анализ типа ОНАР, согласно лейкограмме и ЛК, у животных с локальной ишемией соответствовал реакции стресса (количество лимфоцитов снижалось ниже 30 %), тогда как статистически значимые изменения количества моноцитов, эозинофилов и нейтрофилов свидетельствовали о напряженности реакции и снижении уровня реактивности организма [2].

На 10 сут после воспроизведения хронической ишемии головного мозга крыс (в фазу снижения ЭФПЭ, соответствующую активации симпатoadренальной стресс-реализующей системы) животным были проведены “терапевтические” мероприятия. Установлено, что введение препаратов как базовой терапии (пирарцетам и винпоцетин), так и добавление в комплекс цитофлавина на 60 сут наблюдения приводило к существенному повышению ЭФПЭ как по отношению к 10 сут наблюдения (до введения препаратов), так и по отношению к интактным животным. Вместе с тем, как видно из табл. 1, при добавлении к базовой терапии цитофлавина ЭФПЭ у животных повышалась более значимо. Так же более значимо при добавлении цитофлавина изменялся и ЛК, восстанавливаясь до значений интактных животных. Анализ лейкограммы (табл. 2) при базовой терапии выявил увеличение количества лимфоцитов, однако уровень показателя не достигал нижней границы, показывающей развитие стадии активации, в то время как добавление к курсу терапии цитофлавина определило развитие реакции активации, что позволяет говорить об ограничении стресс-реакции организма, регистрируемой при ишемии. Кроме того, было зарегистрировано восстановление количества других клеток белой крови до показателей интактных животных, что свидетельствует о снижении уровня напряженности реакции организма и повышение его реактивности.

Анализ полученных результатов показывает, что при моделировании ишемии головного мозга у животных наблюдается активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, нарастающая пропорционально повышению уровня ЭФПЭ [6]. Как нами выявлено ранее, двухфазное изменение ЭФПЭ крови является однотипной реакцией на воздействие разных видов стресса, протекающей в соответствии с выраженностью его фаз [5]. Известно, что при стрессовых ситуациях активация симпатoadренальной системы является первичной. Отмечено, что в реакциях на стресс концентрация адреналина в плазме возрастает в десятки раз уже через несколько минут [9]. Путем сложной цепной реакции катехоламина стимулируют образование и поступление во внутреннюю среду гормонов

Таблица 1. Динамика электрофоретической подвижности эритроцитов ($\text{мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) и лейкоцитарного коэффициента экспериментальных животных с локальной ишемией головного мозга ($M \pm m$)

Условия эксперимента	10 сут (до терапии)	60 сут
ЭФПЭ		
Интактные крысы	$1,31 \pm 0,02$ ($n = 20$)	$1,32 \pm 0,02$ ($n = 20$)
Базовая терапия	$0,92 \pm 0,04^*$ ($n = 32$)	$1,47 \pm 0,03^*$ ($n = 12$)
Базовая терапия + цитофлавин		$1,67 \pm 0,02^{*\#}$ ($n = 12$)
ЛК		
Интактные крысы	$3,5 \pm 0,4$ ($n = 20$)	$3,6 \pm 0,3$ ($n = 20$)
Базовая терапия	$2,1 \pm 0,4^*$ ($n = 32$)	$2,4 \pm 0,3^*$ ($n = 12$)
Базовая терапия + цитофлавин		$3,7 \pm 0,4^{\#}$ ($n = 12$)

* $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными; # $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей базовую терапию.

Таблица 2. ЛФ (%) крови экспериментальных животных с локальной ишемией головного мозга ($M \pm m$)

Группа животных	Палочкоядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
Интактные	7,6 ± 1,9	9,8 ± 3,2	0,6 ± 0,4	1,0 ± 0,6	9,6 ± 1,3	71,4 ± 5,1
Локальная ишемия (10 сут)	0,2 ± 0,1*	69,0 ± 0,8*	1,6 ± 0,5*	0,5 ± 0,4	5,2 ± 0,5*	21,5 ± 0,2*
Базовая терапия (60 сут)	10,8 ± 2,2	23,2 ± 2,8*	1,0 ± 0,8	0,5 ± 0,4	7,9 ± 1,8	56,6 ± 5,2*
Базовая терапия + цитофлавин (60 сут)	8,8 ± 2,5	17,5 ± 2,5*#	0,8 ± 0,4	0,5 ± 0,5	6,5 ± 2,0	66,4 ± 4,5*#

* $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными; # $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей базовую терапию.

коры надпочечников. В то время как катехоламины отражают возникновение срочного пускового эффекта, для кортикостероидов характерно долгосрочное действие [18]. Предположение о влиянии на динамику ЭФПЭ стресс-реализующих гормонов было нами подтверждено в опытах, где в эритроцитарную массу крови человека добавляли адреналин и кортизол. Если использование адреналина в концентрации, соответствующей его концентрации в крови в условиях физиологической нормы (10 нг %), не вызывало значительного изменения ЭФПЭ, то добавление адреналина в концентрации, соответствующей его уровню при стрессовых реакциях организма (100 нг%), приводило к уменьшению ЭФПЭ на 15 %. В то же время инкубация эритроцитов с кортизолом (10 – 50 мкг %) определяла статистически значимое дозозависимое повышение ЭФПЭ [7].

Вышеизложенное позволяет предположить, что регистрируемое в настоящей работе первичное уменьшение ЭФПЭ при экспериментальной ишемии головного мозга связано с активацией выделения эндогенных катехоламинов, а вторая фаза — повышение ЭФПЭ — определяется нарастанием в крови гормонов коры надпочечников и имеет долгосрочное действие. Таким образом, результаты измерения ЭФПЭ свидетельствуют о том, что динамика электрокинетических характеристик эритроцитов у ишемизированных крыс сопряжена с последовательной активацией стресс-реализующих систем организма: снижение ЭФПЭ обусловлено активацией симпатoadреналовой системы, тогда как повышение — гипофизарно-надпочечниковой [5, 7]. Можно полагать, что тип общей неспецифической адаптационной реакции, согласно анализу ЛФ и лейкограмме, при локальной ишемии соответствует типичной реакции стресса [2]. При этом развивающиеся моноцитопения, лимфопения и нейтрофилез свидетельствуют о напряженности реакций адаптации, нарушении гармоничности в функционировании подсистем организма и снижении уровня реактивности в ходе усугубления ишемии головного мозга. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ишемии головного мозга животных происходят выраженные изменения гомеостатических показателей организма, проявляющиеся в развитии стрессовой реакции с понижением уровня реактивности организма. В этих условиях курсовое введение цитофлавина на

фоне базовых препаратов антигипоксической терапии (пирацетам и винпоцетин) в большей мере повышает адаптацию организма животных к ишемии, приводя к модуляции стресс-реализующих вегетативных регуляторных систем, в частности, переводя их из реакции стресса в реакцию активации.

ВЫВОДЫ

1. Динамика изменений электрофоретической подвижности эритроцитов, ЛФ и ЛК у крыс с экспериментальной ишемией головного мозга сопряжена с последовательной активацией стресс-реализующих систем организма.

2. Через 10 дней после создания искусственной ишемии головного мозга у животных регистрировали снижение ЭФПЭ на 30 %, ЛК — на 40 % и ЛФ в лейкоцитарной формуле — в 3,3 раза относительно значений данных показателей интактных животных ($p \leq 0,05$).

3. Курсовое (ежедневно, 10 дней) внутрибрюшинное введение пирацетама (200 мг/кг) и винпоцетина (0,7 мг/кг) оперированным животным к 60 сут ишемии вызывало увеличение ЭФПЭ на 59 %, ЛК — на 14 %, ЛФ в лейкоцитарной формуле — в 2,5 раза по сравнению с показателями до лечения ($p \leq 0,05$).

4. Добавление в комплекс к базовой терапии цитофлавина (0,16 мл/кг) вызывало более значимое изменение показателей по сравнению с базовой терапией, что выражалось в увеличении ЭФПЭ на 80 %, ЛК — на 76 %, ЛФ — в 3 раза в отдаленном периоде хронической ишемии мозга ($p \leq 0,05$). Это свидетельствует об улучшении адаптационного баланса стресс-реализующих систем и снижении уровня напряженности вегетативных систем регуляции функций организма животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Афанасьев, *Цитофлавин в интенсивной терапии*, Пособие для врачей, Санкт-Петербург (2005).
2. Л. Х. Гаркави, Е. Б. Квакина, *Адаптационные реакции и резистентность организма*, Изд-во Рост. ун-та, Ростов-на-Дону (1990).
3. А. С. Кадыков, Л. С. Манвелов, Н. В. Шахпоранова, *Хронические сосудистые заболевания головного мозга (дисциркуляторная энцефалопатия)*, ГЭОТАР — Медиа, Санкт-Петербург (2006).

4. Е. Г. Ключева, М. В. Александров, Е. Б. Фомина, *Вестник Санкт-Петербургской гос. мед. акад. им. И. И. Мечникова*, **1 – 2**, 24 – 30 (2002).
5. В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина, *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, **4**, 364 – 366 (2005).
6. В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина, *Рос. физиол. ж. им. И. М. Сеченова*, **96(6)**, 582 – 589 (2010).
7. В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина, *Гематол. и трансфузиол.*, **5**, 18 – 21 (2011).
8. В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина, О. А. Захарова, Е. А. Антипенко, *Клин. лаб. диагностика*, **12**, 28 – 30 (2010).
9. З. Ж. Сейдахметова, *Бюлл. СОРАМН*, **3 – 4**, 93 – 95 (2005).
10. Е. В. Силина, С. А. Румянцева, *Вестник интенсив. тер.*, **2**, 82 – 88 (2006).
11. Ф. И. Тодуа, Д. Г. Гачечиладзе, М. В. Берая, Д. В. Берулава, *Ангиол. и сосуд. хирургия*, **11(2)**, 37 – 32 (2005).
12. В. Д. Трошин, *Стресс и стрессорные расстройства*, Медицинское информационное агентство, Москва (2007).
13. В. Д. Трошин, А. В. Густов, А. А. Смирнов, *Сосудистые заболевания нервной системы*, Изд. НГМА, Н. Новгород (2006).
14. А. И. Федин, С. А. Румянцева, М. А. Пирадов и др., *Вестник Санкт-Петербургской гос. мед. акад. им. И. И. Мечникова*, **1**, 13 – 19 (2005).
15. А. И. Федин, С. А. Румянцева, М. А. Пирадов и др., *Врач*, **13**, 52 – 58 (2006).
16. R. Gill, C. Brazell, G. N. Woodruff, J. A. Kemp, *Br. J. Pharmacol.*, **103(4)**, 2030 – 2036 (1991).
17. L. Rosemary, *J. Clin. Neuroscience*, **5(3)**, 31 – 36 (1997).
18. B. S. Sunanda Rao, T. R. Raju, *Neurochem. Res.*, **25(12)**, 1547 – 1552 (2000).

Поступила 29.08.16

STRESS-PROTECTIVE EFFECT OF CYTOFLAVIN ON CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS

V. N. Krylov¹, A. V. Deryugina¹, and E. A. Antipenko²

¹ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, ul. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, GSP-20, 603950 Russia

² Nizhny Novgorod State Medical Academy, pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, GSP-470, 603950 Russia

Analysis of stress-releasing blood reactions (electrophoretic mobility of red blood cells, WBC count, and leukocyte ratio) in rats with experimental cerebral ischemia under the action of cytoflavin held showed that cytoflavin in combination with basic therapy leads to further activation of compensatory-adaptive reactions of the body and stimulated peripheral stress-limiting mechanisms.

Keywords: cytoflavin; chronic cerebral ischemia; compensatory-adaptive reactions; stress-protective action.