

ЗАЩИТНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ У КРЫС В РАЗНОЕ ВРЕМЯ СУТОК

Э. Б. Арушанян, С. С. Наумов, В. А. Пономарёва¹

Хроническое введение эпифизарного гормона мелатонина улучшает познавательную деятельность и стимулирует подвижность крыс отчетливее в вечерние часы. На фоне действия мелатонина ослабляются поведенческие и морфологические нарушения, вызываемые черепно-мозговой травмой. Защитный эффект гормона проявляется слабее при утренних повреждениях мозга.

Ключевые слова: мелатонин, нейропротекция, черепно-мозговая травма

ВВЕДЕНИЕ

Гормон эпифиза мелатонин обладает рядом нейропротекторных свойств, которые позволяют рассматривать его в качестве потенциального ноотропного агента [1]. Исходя из этого, возникает вопрос — распространяется ли защитное действие гормона и на поведенческие нарушения, обусловленные травматическим повреждением головного мозга. Известно, что мелатонин служит естественным хронобиотиком, участвующим в организации биоритмических процессов в организме. Последние придают колебательный характер различным показателям когнитивной деятельности мозга, в том числе определяют ее флюктуации при органической умственной недостаточности [2]. Отсюда представляется интересным дополнительно определить значение времени суток для выраженности протекторного эффекта эпифизарного гормона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнено несколько серий опытов на 60 белых беспородных крысах-самцах массой 160 – 190 г, которых содержали в обычных условиях вивария при фиксированном световом режиме со свободным доступом к пище и воде. Предварительно у всех животных определяли некоторые показатели когнитивной деятельности и двигательной активности с помощью традиционных методик условно-рефлекторного пассивного избегания (УРПИ) и открытого поля (ОП) [5]. В челночной камере с электрифицированным полом вырабатывали избегательную реакцию, сохранность которой оценивали на следующий день. При этом латентный период ответа (в с) служил критерием прочности сформированного памятного следа. В ОП стандартного размера на протяжении 5 мин учитывали несколько параметров поведения крыс: исследовательскую активность (по числу вертикальных стоек), подвижность (количество пересеченных периферических сегментов поля), частоту очистительных действий (груминга). Затем

животных разделили на две группы — опытную, которая в течение 15 дней получала внутривенно мелатонин (1 мг/кг, препарат мелахсен фирмы “Unipharm Inc.”, США), и контрольную — введение в таком же объеме физиологического раствора. После завершения инъекций каждая из них в свою очередь подразделялась на две подгруппы. В одной поведенческие реакции регистрировали в утренние (7.00 – 8.00), во второй — в вечерние (19.00 – 20.00) часы.

На следующем этапе исследования всем животным, фиксированным в специальном устройстве, под фторотановым наркозом наносили механический удар на правую теменную область. При травмировании мозга использована модель «ударного ускорения» [4], для чего была создана специальная установка, позволявшая точно проецировать и дозировать силу удара свободно падающего груза с таким расчетом, чтобы не происходило перелома костей черепа. Одной половине животных черепно-мозговую травму (ЧМТ) наносили в указанные выше утренние, а другой — в вечерние часы. В дальнейшем равное число крыс (по 5 особей) умерщвляли под фторотановым наркозом, спустя 24, 48 и 72 ч после ЧМТ. Извлеченный мозг оценивали макроскопически (локализация и размеры повреждения, наличие отека), затем формализировали и на замораживающем микротоме (“ТЕХНОМ МЗП-1003”) делали серийные срезы с последующей окраской гематоксилин-эозином без депарафинирования. Посредством светооптической микроскопии характеризовали общую гистологическую картину ЧМТ, в 10 полях зрения подсчитывали количество полнокровных и поврежденных сосудов.

Полученные результаты обработаны количественно методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента при помощи пакета компьютерных программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

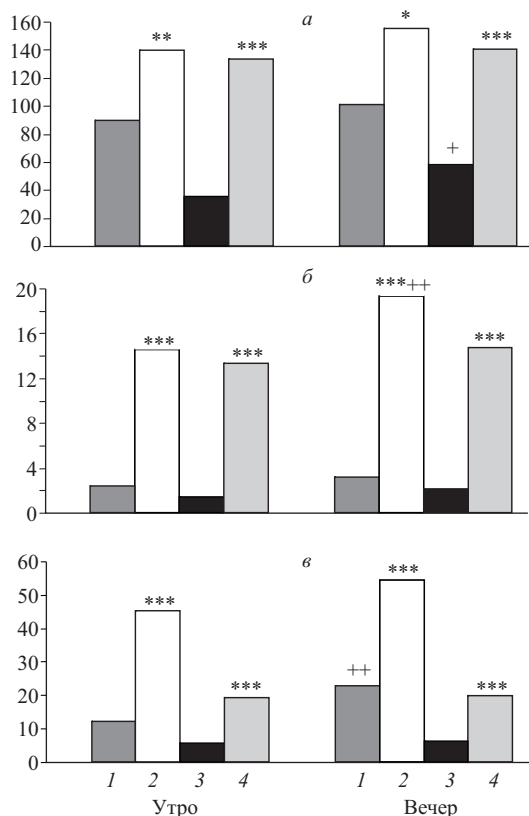
Сравнение поведенческой активности крыс в разное время суток свидетельствовало о том, что в конце дня она оказывалась несколько выше. Если судить по длине латентного периода УРПИ, то в вечерние часы

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. Э. Б. Арушанян) Ставропольской медицинской академии, Ставрополь, 355017, ул. Мира, 310.

лучше была память, выше исследовательская и двигательная активность, о чем говорило большее число вертикальных стоек и пересеченных сегментов в ОП. Та же закономерность сохранялась у контрольных животных, получавших инъекции физиологического раствора (табл. 1). Это согласуется с этологическими особенностями крыс, ведущих, как известно, ночной образ жизни и, очевидно, начинающих активироваться перед наступлением темного периода суток.

Мелатонин обладал способностью оптимизировать поведение животных с достоверным (по отношению к результатам контрольной серии) удлинением латентности избегательного ответа, увеличением вертикального и горизонтального компонентов поиска в ОП, учащением груминга. Исходя из абсолютных значений изученных показателей, можно констатировать их более заметное, хотя и статистически незначимое, повышение в вечернее время по сравнению с результатами определений в начале дня (рисунок, табл. 1). Локальная ЧМТ сопровождалась существенными поведенческими расстройствами. В течение первых суток большинство крыс отказывалось от приема пищи и воды, слабо реагировало на внешние раздражения, возникали нарушения в координации движений и мышечном тоне. Резко падало число вертикальных стоек и пересеченных сегментов, но, несмотря на это, укорачивался латентный период УРПИ, свидетельствуя о резком ухудшении памяти. Эти сдвиги на протяжении нескольких дней регистрации имели тенденцию к ослаблению, однако, полной нормализации поведения обнаружить не удалось даже через трое суток после нанесения ЧМТ. Ухудшение абсолютной величины поведенческих показателей было отчетливее при утренних тестированиях (рисунок, табл. 1).

Расстройствам в поведении при ЧМТ соответствовала определенная патоморфологическая картина. Согласно результатам макроскопической оценки мозга



Влияние мелатонина в разное время суток на поведение интактных крыс и через 72 ч после черепно-мозговой травмы (ЧМТ).

a — латентный период условной реакции пассивного избегания (*с*), *б* — абсолютное число вертикальных стоек, *в* — количество пересеченных сегментов в открытом поле.

1 — контрольная группа (инъекции физиологического раствора), *2* — введение мелатонина интактным животным, *3* и *4* — инъекции соответственно физиологического раствора и мелатонина крысам с ЧМТ.

* — достоверный сдвиг по отношению к контрольным животным и + — при сравнении результатов утренних и вечерних серий, один, два и три значка — для $p < 0,05; 0,01$ или $0,001$ соответственно.

контрольных животных, в правой теменной области

Таблица 1. Влияние мелатонина на показатели поведенческой активности интактных крыс и травмированных животных в разные сроки после ЧМТ и в различное время суток

Группа	Методы исследования	Утренние определения				Вечерние определения			
		До ЧМТ <i>n</i> = 15	После ЧМТ			До ЧМТ <i>n</i> = 15	После ЧМТ		
			24 ч <i>n</i> = 5	48 ч <i>n</i> = 5	72 ч <i>n</i> = 5		24 ч <i>n</i> = 5	48 ч <i>n</i> = 5	72 ч <i>n</i> = 5
Физиологический раствор	УРПИ, с	90 ± 2,1	9,2 ± 1,8***	20,6 ± 2,1***	35,6 ± 1,9***	120 ± 2,1	15,7 ± 2,3***	46,3 ± 1,4***	58,9 ± 1,8**
	Вертикальные стойки	2,9 ± 0,4	0	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,2	7,3 ± 0,5	1,4 ± 0,2*	1,3 ± 0,2*	2,1 ± 0,4*
	Пересеченные сегменты	9,1 ± 2,7	2,3 ± 0,8**	4,3 ± 1,2*	5,6 ± 1,3	22,5 ± 2,8	2,7 ± 1,6***	4,7 ± 1,8***	6,3 ± 2,6***
Мелатонин	УРПИ, с	140 ± 2,1***	120,1 ± 1,2***	127,4 ± 1,3	133,3 ± 1,8***	155 ± 2,1**	129,5 ± 2,1***	135,5 ± 1,2***	140,5 ± 1,9***
	Вертикальные стойки	14,6 ± 0,8**	6 ± 0,4	8,1 ± 0,5**	13,3 ± 0,4**	19,3 ± 1,1**	5,8 ± 0,8**	8,9 ± 0,3**	14,7 ± 0,5**
	Пересеченные сегменты	45,4 ± 3,9***	15,8 ± 0,9**	17,2 ± 0,8**	19,3 ± 0,7**	54,5 ± 4,1***	16,4 ± 2**	17,6 ± 0,9**	19,9 ± 0,8**

Примечание. *n* — количество животных в группе; сдвиги достоверны по сравнению: * — с определениями до травмы, + — с результатами контрольной серии (физ. раствор); *, **, ***, +, ++, *** — при $p < 0,05; 0,01; 0,001$ соответственно.

после нанесения механического удара всегда возникал контузионный очаг без четких границ с признаками отека и расширением сосудистого русла. Гистологический анализ материала свидетельствовал о гиперемии во всех слоях неокортекса и подлежащих субкортикальных структурах с очагами кровоизлияний. Отмечались также значительное расширение миелиновых оболочек волокон, обширные участки отека, сопровождающиеся глиальными инфильтратами. Эти явления были максимально выражены в первые сутки после травматизации и, не исчезая полностью, прогрессивно ослабевали на третий день эксперимента.

Кроме того, имело значение время нанесения ЧМТ. При сравнении мозга утренних и вечерних серий можно отметить, что в последнем случае патоморфологические изменения проявлялись слабее. Так, если среднее количество (в 10 полях зрения) полнокровных и поврежденных сосудов утром соответственно равнялось 23 ± 3 и 64 ± 8 , то в вечернее время — 18 ± 2 и 55 ± 7 .

Как показывает изучение животных, которые предварительно хронически получали мелатонин, спустя 72 ч после ЧМТ под влиянием гормона ограничиваются ее поведенческие и морфологические последствия. По сравнению с контрольными крысами у них достоверно выше оказывалась латентность реакции УРПИ, иными словами, меньше страдала память, больше было число вертикальных стоек и пересеченных сегментов. Результаты вечерних определений также несколько превосходили по абсолютной величине данные, полученные утром, хотя и не столь заметно, как до повреждения мозга (рисунок, табл. 1).

На фоне мелатонина слабее проявлялись и морфологические сдвиги, обусловленные травмой. По сравнению с контрольными животными менее выражен отек мозга и более ограничены размеры контузионного очага. Защитный эффект гормона отчетливее проявлялся вечером: через 72 ч после травмы площадь очага в этот период суток составляла $0,6 \pm 0,1 \times 0,7 \pm 0,2$ мм (утром $0,7 \pm 0,1 \times 0,9 \pm 0,3$ мм). Подтверждением гормональной нейропротекции служили также изменения гистологической картины мозговой ткани в виде мень-

шей выраженности гиперемии во всех слоях серого вещества, исчезновения участков локального отека.

Относительным критерием существования у гормона защитного действия может служить подсчет числа полнокровных и поврежденных сосудов. Спустя 72 ч после травмы у контрольных животных их количество оставалось достаточно высоким. Однако на фоне действия мелатонина к этому моменту они полностью отсутствовали, при этом нормализующий эффект в динамике заметно нарастал в разные сроки после травмы, будучи более отчетливо выраженным в случае вечерних повреждений (табл. 2).

Таким образом, согласно полученным результатам, эпифизарный мелатонин оказывает активирующее влияние на познавательные процессы (память, исследовательское поведение) и моторику у крыс, благодаря чему, вероятно, ограничивает поведенческие и морфологические нарушения, вызванные ЧМТ. Как у интактных, так и травмированных животных защитный эффект предварительных инъекций гормона несколько сильнее выражен в конце дня и в случае вечерних повреждений мозга.

Установленная в работе способность мелатонина оптимизировать когнитивную деятельность крыс совпадает с результатами других наблюдений. Так, в исследовании на здоровых людях ранее показано увеличение объема зрительной и слуховой памяти после введения низких доз гормона [3]. С этими данными согласуется показанная в этой работе его способность ослаблять поведенческие расстройства после ЧМТ, как и сопутствующие ей патоморфологические сдвиги. В основе защитного эффекта мелатонина, по-видимому, может лежать целый комплекс причин.

Известно, что церебральная ишемия различного (в том числе травматического) генеза сопровождается повреждением нервных клеток под влиянием множества факторов. К ним относятся усиленное накопление свободных радикалов и падение антиоксидантного потенциала мозговой ткани, нарастание апоптоза и нейротоксичности возбуждающих аминокислот, ослабление нейрогенерации и т.п. [6]. Мелатонин же, по литературным сведениям, способен не только

Таблица 2. Влияние мелатонина на патоморфологические сдвиги в разные сроки после ЧМТ, наносимой в утренние и вечерние часы

Название группы $n = 10$	Количество полнокровных сосудов	Количество поврежденных сосудов
Физ. раствор (утро) — через 72 ч после ЧМТ	23 ± 3	64 ± 8
Физ. раствор (вечер) — через 72 ч после ЧМТ	$18 \pm 2^+$	$55 \pm 7^+$
Мелатонин (утро) — через 24 ч после ЧМТ	$14 \pm 3^{**}$	$31 \pm 5^{***}$
Мелатонин (вечер) — через 24 ч после ЧМТ	$11 \pm 6^*$	$29 \pm 4^{***}$
Мелатонин (утро) — через 48 ч после ЧМТ	$9 \pm 2^{***}$	$15 \pm 3^{***}$
Мелатонин (вечер) — через 48 ч после ЧМТ	$5 \pm 2^{**}$	$9 \pm 2^{***+}$
Мелатонин (утро) — через 72 ч после ЧМТ	1 – 2 в поле зрения	$3 \pm 1^{***}$
Мелатонин (вечер) — через 72 ч после ЧМТ	0	0

Примечание. n — количество полей зрения, в которых производился подсчет; сдвиги достоверны по сравнению: * — с результатами контрольной серии (физ. раствор); + — при сравнении утренних и вечерних серий (физ. раствор); *, **, ***, +, ++, +++ — при $p < 0,05; 0,01; 0,001$ соответственно.

ограничивать ишемические явления, но и вмешиваться практически во все перечисленные процессы.

Как установлено в опытах на крысах, на фоне хронического введения мелатонина снижается риск церебральной ишемии, вызванной гипоперфузией средней мозговой артерии, уменьшается отек мозга и зона инфаркта при ее окклюзии, а удаление эпифиза усугубляет подобные нарушения [10, 11, 13]. В то же время гормон может выступать в роли “ловушки” свободных радикалов, предупреждать гибель нейронов мозга от любых видов нейротоксического воздействия, усиливать регенерацию за счет вмешательства в функцию нейротрофинов [7, 9, 12]. Очевидно, за счет этих и некоторых других клеточных механизмов мелатонин и обеспечивает свой протекторный эффект в отношении поведенческих и морфологических сдвигов, обусловленных ЧМТ.

Судя по представленным фактам, на выраженности психотропного действия у интактных животных и успешности нейропротекции при травме мозга заметно сказывается временной фактор. То и другое отчетливее проявляется в конце дня, что правомерно объяснить особенностями суточной динамики естественной активности эпифиза. Железа начинает секретировать мелатонин в вечерние часы, максимум его выработки приходится на полночь, а к утру заметно падает, оказываясь минимальной днем [8]. Учитывая показанные нами защитные свойства мелатонина, возможно, этим обусловлена и меньшая выраженность поведенческих и морфологических расстройств при нанесении ЧМТ в вечернее время.

ВЫВОДЫ

1. Эпифизарный гормон мелатонин (1 мг/кг, хронически) улучшает у крыс память в челночной камере и стимулирует поведенческую активность в открытом поле. Эффект гормона имеет тенденцию к большей выраженности при вечерних определениях по сравнению с утренними, совпадая с динамикой естественной секреторной активности эпифиза.

2. Локальная черепно-мозговая травма (ЧМТ) с грубыми патоморфологическими сдвигами нарушает по-

ведение животных, отчетливее при травмировании мозга в начале дня. Через 72 ч после ЧМТ наблюдается постепенное восстановление поведенческих и морфологических показателей без полной ликвидации ее последствий.

3. На фоне повторного применения мелатонина слабее выражены расстройства поведения и дефекты в мозговой ткани. Отмечается тенденция к более быстрой компенсации тех и других нарушений по сравнению с контрольными животными, получавшими физиологический раствор. Защитное действие гормона несколько сильнее проявляется при ЧМТ в вечерние часы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. Б. Арушанян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(2), 74 – 79 (2005).
2. Э. Б. Арушанян, *Ж. неврол. и психиат.*, **105**(11), 73 – 78 (2005).
3. Э. Б. Арушанян, О. А. Байда, С. С. Мастягин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(1), 21 – 23 (2006).
4. В. В. Белошицкий, *Нейронауки: экспер. и клин. аспекты*, 81 – 87 (2005).
5. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, М., 153 – 158 (2000).
6. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, М., Медицина, (2001).
7. M. Allegra, R. J. Reiter, D. K. Tan, et al., *J. Pineal. Res.*, **34**(2), 1 – 10 (2003).
8. J. Arendt, *Melatonin and the mammalian pineal gland*, London (1994).
9. S. Cho, T. H. Jon, H. H. Baik, et al., *Brain Res.*, **755**(2), 335 – 338 (1997).
10. E. Kilic, Y. Y. Ozdemir, and H. Bolay, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **19**, 511 – 516 (1999).
11. T. Kondoh, H. Uneyama, and H. Nishino, *Life Sci.*, **72**, 583 – 590 (2002).
12. G. Olivieri, U. Otten, F. Meier, et al., *Neuroscience*, **120**, 659 – 665 (2003).
13. K. Sinha, M. N. Degaonkar, and N. R. Jayannathan, *Eur. J. Pharmacol.*, **428**, 183 – 192 (2002).

Поступила 03.09.08

PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN ON BEHAVIORAL AND MORPHOLOGICAL DISTURBANCES INDUCED BY CEREBROCRANIAL TRAUMA IN DIFFERENT DAYTIME IN RATS

E. B. Arushanyan, S. S. Naumov, and V. A. Ponomareva

Department of Pharmacology, Stavropol State Medical Academy, ul. Mira 310, Stavropol, 355017, Russia

Chronic administration of the pineal hormone melatonin improves the cognitive activity and stimulates locomotion in rats, the effect being more pronounced in evening hours. On the background of melatonin action, local cerebrocranial trauma produces less pronounced behavioral and morphological disturbances, which more rapidly disappear after brain injury in the evening. The protective effect of the hormone is less pronounced in the morning hours.

Key words: Melatonin, neuroprotector, cerebrocranial trauma.