

DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-2-23-27

НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ СПОСОБНОСТЬ АФОБАЗОЛА В ЗАЩИТЕ ИШЕМИЗИРОВАННОГО МОЗГА

М. Г. Баласанян¹, А. С. Канаян¹, А. В. Топчян¹, В. П. Акопян¹

Морфологическими исследованиями осуществлена оценка защитного эффекта афобазола на экспериментальной модели ишемического инсульта, вызванного окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА). Выявлено, что на фоне применения препарата в дозе 5 мг/кг дважды в день отмечается хорошая сохранность стриопаллидарной системы, зона ишемического некроза коры головного мозга оказывается четко ограниченной, характеризуется ранней реперфузией и хорошей сохранностью нейроцитов базальных и гипоталамических ядер, уменьшается выраженность гипоксических повреждений нейроцитов коры полей Сg1 и Сg2. Нейропротекторный эффект афобазола сохраняется как при предварительном введении, так и при использовании препарата в пределах терапевтического окна, что проявляется устранением субарахноидального отека, сохранностью нейроцитов перифокальной зоны и ревазуляризацией зоны ишемии при введении препарата через 6 ч после ОСМА. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженном защитном эффекте афобазола в условиях локально ишемических повреждений головного мозга.

Ключевые слова: афобазол; локальная ишемия мозга; морфологические сдвиги; нейропротекция.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на успехи в изучении механизмов церебральной ишемии и разработке основных стратегий нейропротективной терапии, на сегодняшний день проблема фармакологической коррекции острых нарушений мозгового кровообращения остается нерешенной, поскольку клинические возможности многих считавшихся перспективными лекарственных средств (ЛС) оказались ограниченными [4]. В связи с этим, интерес к научному и практическому поиску средств защиты головного мозга (ГМ) продолжает расти [15].

Особого внимания заслуживает стратегия фармакологической нейропротекции, направленная на изыскание ЛС, устраняющих нейротрансмиттерный дисбаланс и недостаточность естественных защитных механизмов путем активации тормозных систем повышением тормозных ГАМК-ергических процессов [11]. При этом, ввиду многообразия реакций, приводящих к формированию инфаркта ГМ на фоне фокальной ишемии, одномоментное воздействие на разные звенья ишемического каскада способствует усилению нейропротекторного эффекта [9].

В связи с вышеизложенным нами исследована нейропротекторная способность афобазола — оригинального селективного анксиолитика, разработанного в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. Выбор афобазола продиктован особенностями механизма его действия: показано, что препарат препятствует развитию мембранозависимых изменений в ГАМК-бензо-

дiazепиновом рецепторном комплексе, приводящих к снижению доступности рецепторного участка для лиганда, т.е. повышает аффинность эндогенного лиганда к рецептору, способствуя тем самым усилению ГАМК-ергических процессов [10]. Раскрыт рецепторный профиль препарата, включающий помимо не прямых ГАМК-ергических также и сигма-агонистические [6, 13], дофаминергические [14], мембраностабилизирующие свойства, подтверждающие возможности его применения, в качестве перспективного нейропротектора. Афобазол уменьшает опосредованную накоплением внутриклеточного Ca^{2+} эксайтотоксичность и апоптоз нейронов [8], усиливает антиоксидантную систему защиты ГМ и повышает устойчивость мембранных структур нейронов ЦНС к свободнорадикальному повреждению и окислительному стрессу на фоне ишемии [5], обладает цереброангиопротекторными свойствами [3].

В представленной статье приведены морфологические доказательства нейропротекторной способности афобазола в защите ишемизированного ГМ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах-самцах массой 180 – 220 г. под общей анестезией хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно). Моделирование локальной ишемии ГМ крыс, вызванной окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА), проводилось по А. Tamura et al, в модификации А. В. Топчяна и соавт. [7].

Животным, разделенным на 4 группы (по 11 крыс в каждой группе) сразу же после ОСМА начинали вво-

¹ Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци, Армения, 0025, Ереван, ул. Корюна, 2.

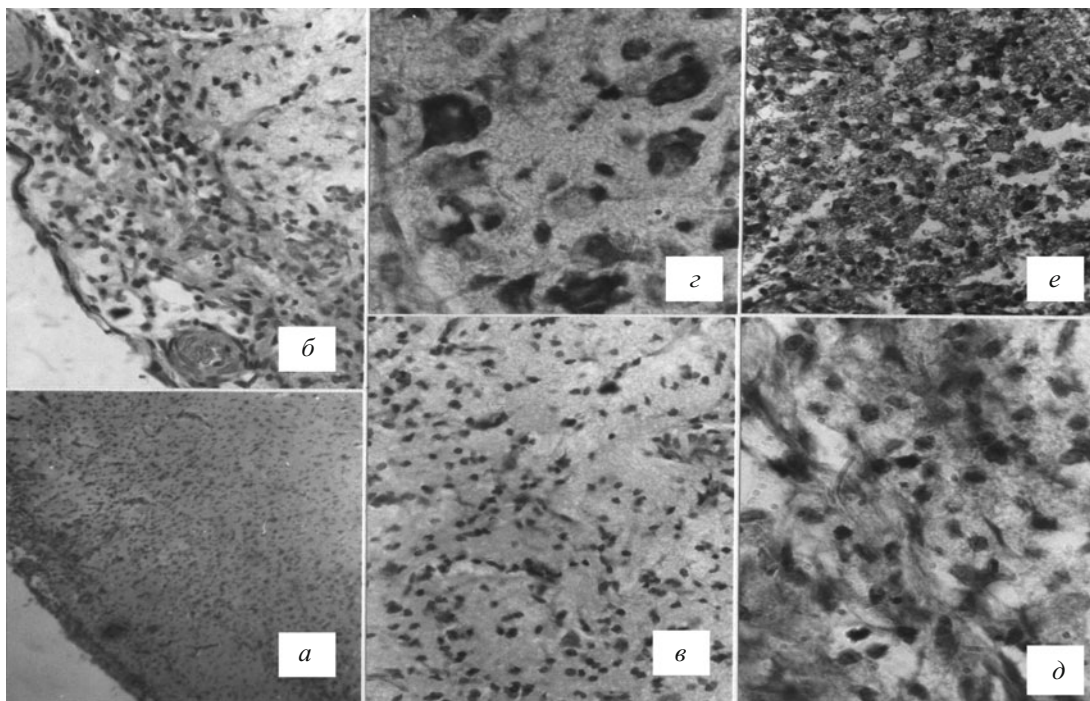


Рис. 1. Зона ишемии на 6 сут эксперимента на фоне применения афобазола:

a — зона ишемии ограничена, локализована в области Ptg; *б* — сосуды мягкой мозговой оболочки полнокровны, умеренная инфильтрация лимфоцитами с примесью гранулоцитов; *в* — сохраненные сосуды и признаки ревазуляризации; *г* — нейроны Ptg в зоне ишемии гиперхромные, в состоянии хроматолиза и нейронофагии при относительно сохранных ядрах; *д* — ограниченная макрофагальная реакция, исходящая со стороны мягкой мозговой оболочки; *е* — у крысы без применения афобазола макрофагальная реакция интенсивная, распространенная. Окраска: *a, б, в, е* — гематоксилин и эозин; *г, д* — по Нисслю. Увеличение: *a* — $\times 100$; *б, в, е* —

дуть: животным I группы - изотонический раствор хлорида натрия дважды в день в течение 6 сут; животным II группы — афобазол в дозе 5 мг/кг в течение 6 сут; животным III группы — изотонический раствор хлорида натрия дважды в день в течение 12 сут; животным IV группы — афобазол в дозе 5 мг/кг в течение 12 сут. Все эксперименты проводились в период между 9 и 14 ч при температуре лабораторного помещения 22 ± 1 °C. Все манипуляции, проводимые с животными в ходе экспериментов, осуществлялись с учетом принятых международных стандартов обращения с лабораторными животными.

С целью осуществления морфологических исследований ГМ животных всех групп сразу же после извлечения из черепной коробки помещали в забуференный по Лилли 10 % раствор формалина. Из фиксированного материала во фронтальной плоскости вырезали тканевой блок с охватом обоих полушарий от уровня брегма — 0,92 мм толщиной 5 мкм и заливали в парафин. Готовили серийные парафиновые срезы толщиной 10 мкм. Для обзорного гистологического исследования брали каждый 20-й срез, срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Промежуточные срезы окрашивали тионином по Нисслю. Для определения содержания рибонуклеопротеина (РНП) срезы окрашивали метиловым зеленым-пиронином по Браше. Активные аминокислоты белков выявляли методом

нингидрин-реактивом Шиффа по Янсума и Итчикава. Для обнаружения гликопротеидов и гликогена использовали ШИК — реакцию с предварительной обработкой контрольных срезов амилазой. Применяли также метод пикро-Малори II для выявления фибрина форменных элементов и реологических свойств крови в сосудистом русле ГМ, что особенно наглядно проявлялось на уровне МЦР. Эксперименты проведены с использованием гистологической техники по общепринятым гистологическим и гистохимическим методам исследования. При постановке метода пикро-Маллори II пользовались методическими рекомендациями Д. Д. Зербино и соавт. [1].

Маркировку участков ГМ производили, руководствуясь стереотаксическими координатами G. Paxinos, Ch. Watson [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка защитного эффекта афобазола проводилась на разработанной нами модели ишемического инсульта путем перевязки средней мозговой артерии у ее основания. Ранее проведенное в нашей лаборатории изучение динамики морфологических изменений тканей ГМ как ипсилатеральной, так и симметричных зон контралатерального полушария ГМ крыс выявило, что локальная ишемия ГМ, вызванная окклюзией левой средней мозговой артерии сопровождается билатер-

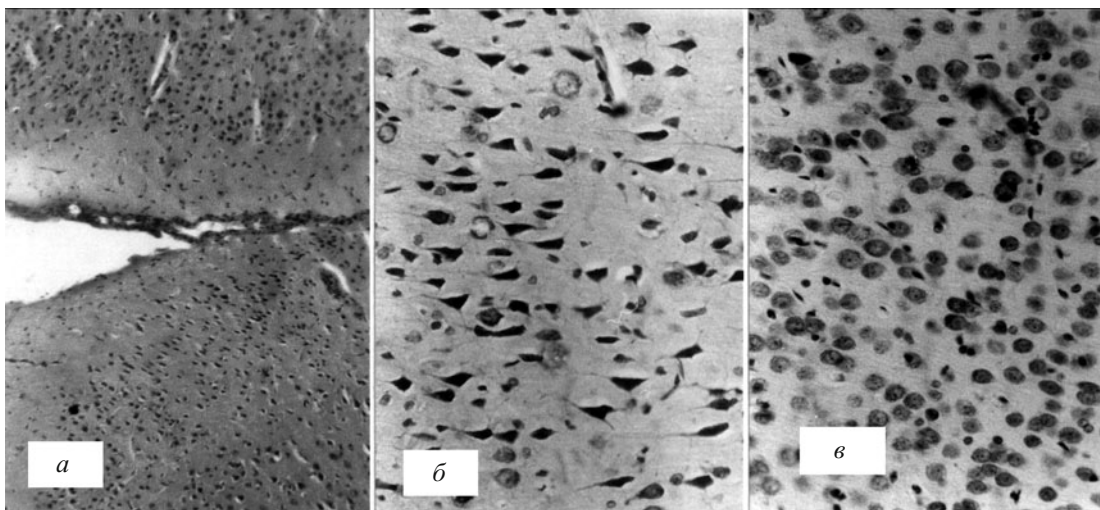


Рис. 2. Головной мозг крысы в различные сроки эксперимента:

a — пикноз нейроцитов полей Cg1 и Cg2 обоих полушарий после применения афобазола в течение 6 сут; *б* — на 6 сут после применения афобазола пикноз нейроцитов поля Cg1 ипсилатерального полушария; *в* — на 12 сут после применения афобазола полная нормализация нейроцитов в поле Cg1.

ральными нарушениями мозгового кровотока, гипоксическими повреждениями нейроцитов коры с последующей их внутриклеточной регенерацией. Развиваются метаболические и структурные изменения не только нейроцитов коры, но и проводящих путей и синаптических терминалей [2].

При исследовании влияния афобазола на динамику морфологических изменений головного мозга крысы в условиях локальной ишемии ГМ в условиях локальной ишемии, вызванной односторонней перевязкой средней мозговой артерии, было установлено (рис. 1), что при внутрибрюшинном введении афобазола сразу же после перевязки средней мозговой артерии в дозе 5 мг/кг дважды в день в течение 6 суток зона ишемии, по сравнению с перевязкой уже незначительных размеров, ограничена небольшим участком Pir (зона пирамидальной коры). Мягкая мозговая оболочка несколько отечная, сосуды ее полнокровные (в зоне повреждения). На этом же участке замечается умеренная инфильтрация мозговой оболочки лимфоцитами со скудной примесью нейтрофилов. Со стороны мягкой мозговой оболочки по направлению к зоне повреждения наблюдается наплыв макрофагов в виде компактного тяжа. В самой зоне ишемии наблюдается выраженный глиоз. Здесь же наблюдаются пикноморфные нейроциты Pir, у которых, однако зачастую имеется хорошо сохранившееся ядро. В зоне формирующегося рубца обнаруживаются предсуществующие и новообразованные капилляры. Область СРи в обоих полушариях хорошо сохранена, без заметных патологических изменений (в отличие от нелеченых крыс, у которых зачастую развивался некроз СРи на стороне перевязки). Правое (противоположное) полушарие по всем полям не отличается от такового интактных крыс. В левом полушарии (сторона перевяз-

ки) в зоне Cg1 по всем слоям коры выявляются гиперхромные и пикнотичные нейроциты. В полях Fl, Par1 и Par2 в V слое коры (слева) выявляются единичные пикнотичные нейроциты. Сосудистые сплетения боковых и III желудочка без патологических изменений.

При продолжении применения афобазола в течение 12 сут в условиях локальной ишемии ГМ, вызванной односторонней перевязкой средней мозговой артерии крыс, было установлено (рис. 2, 3), что при внутрибрюшинном введении афобазола в дозе 5 мг/кг дважды в день в течение 12 сут зона ишемии по сравнению с применением препарата в течение 6 суток еще более уменьшена в размерах в результате сформировавшегося глиального рубца. Сохраняется отечность мягких мозговых оболочек и их инфильтрация лимфоцитами и нейтрофилами. Часто инфильтрат приобретает характер периваскулярных муфт. Макрофагальная реакция практически отсутствует. Появляются толстостенные сосуды. Нейроциты, непосредственно примыкающие к рубцу, хорошо сохранены. В области рубца обнаруживаются единичные пикноморфные нейроциты. Как и в предыдущем сроке наблюдения, правое полушарие без патологических изменений. В левом полушарии в поле Cg1 происходит полное восстановление структуры нейроцитов, по сравнению с предыдущим сроком исследования. Восстанавливается полностью структура всех слоев коры в полях Fl, Par1 и Par2. Как и на 6 сутки эксперимента, СРи без патологических изменений.

В обоих сроках наблюдения на фоне применения афобазола со стороны сосудов вещества мозга как ипсил-, так и контралатерального полушарий явления вазодилатации, вазоконстрикции или дистонии не были обнаружены, в отличие от таковых у нелеченных крыс.

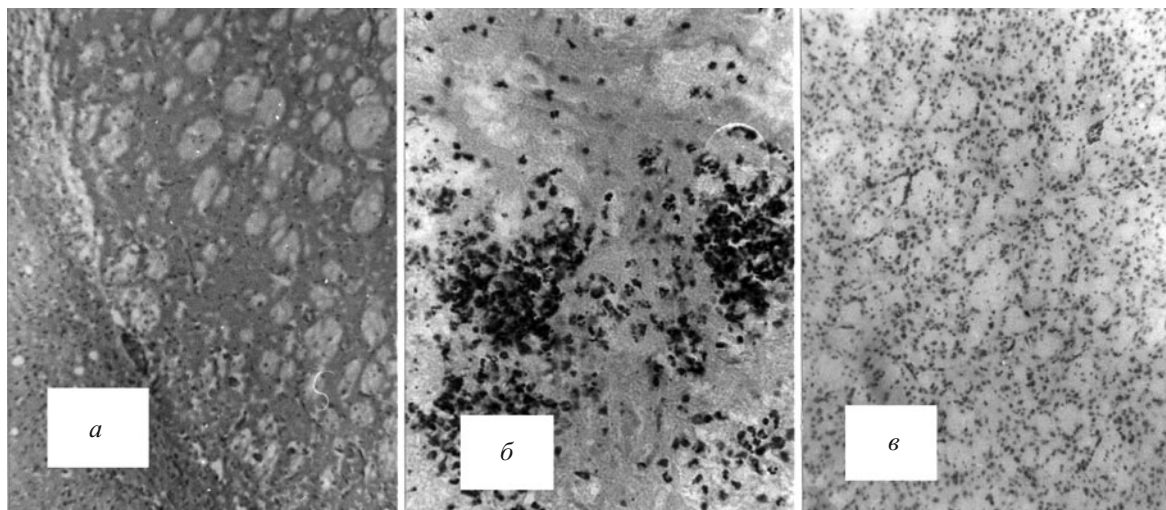


Рис. 3. Область ипсилатеральной СРи на 12 сут эксперимента:

a — СРи нелеченной крысы в состоянии полного некроза; *б* — здесь же очаговая лейкоцитарная инфильтрация; *в* — полная сохранность СРи на фоне применения афобазола. Окраска: *a, б* — гематоксилин и эозин, *в* — по Нислю. Увеличение: *a, в* — $\times 100$; *б* — $\times 400$.

Итак, результаты морфологических исследований по изучению эффектов афобазола на структурные изменения в условиях локальной ишемии, вызванной окклюзией средней мозговой артерии, свидетельствуют о выраженном защитном эффекте препарата. В первую очередь следует отметить на фоне применения препарата хорошую сохранность СРи, т.е. стриопаллидарной системы, которая более всего страдала у крыс в условиях ишемии. После введения афобазола в дозе 5 мг/кг дважды в день зона ишемического некроза коры оказывается четко ограниченной, (пенумбра практически отсутствует) и характеризуется ранней реперфузией. При применении препарата отмечается и хорошая сохранность нейроцитов: афобазол оказывает выраженное протективное воздействие в отношении нейроцитов базальных и гипоталамических ядер. Афобазол способствует также и хорошей сохранности нейроцитов коры полей Cg1 и Cg2 контралатерального полушария. В симметричных полях коры ипсилатерального полушария в значительной степени уменьшается выраженность гипоксических повреждений нейроцитов.

Обращает на себя внимание то, что афобазол способствует нормализации мозгового кровообращения в обоих полушариях, что указывает на то, что препарат, по всей вероятности, воздействует на нейромедиаторные процессы, предотвращая расстройства мозгового кровообращения в виде дистонии, полнокровия и тромбоза мозговых сосудов.

Особого внимания заслуживает тот факт, что нейропротекторный эффект афобазола сохраняется не только при предварительном введении, но также и при использовании препарата в пределах терапевтического окна. Более того, по некоторым признакам защитный эффект препарата при введении его через 6 часов после перевязки средней мозговой артерии был более

выражен, что особенно проявилось в отношении устранения субарахноидального отека, сохранности нейроцитов перифокальной зоны и реваскуляризации зоны ишемии.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что афобазол восстанавливает нарушенную в условиях локальной ишемии структуру мозговой ткани.

ВЫВОДЫ

1. Афобазол в дозе 5 мг/кг предотвращает развитие наблюдаемых в условиях локально ишемических нарушений структурных изменений стриопаллидарной системы, способствует хорошей сохранности и уменьшению выраженности гипоксических повреждений нейроцитов.
2. При введении афобазола через 6 ч после перевязки средней мозговой артерии отмечается устранение субарахноидального отека, хорошая сохранность нейроцитов перифокальной зоны и реваскуляризация зоны ишемии.
3. Афобазол проявляет нейропротекторный эффект как при предварительном введении, так и при использовании препарата в пределах терапевтического окна.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зербино Д. Д., и др., *Элективные методы окраски фибрина для патогистологической диагностики синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС). Методологические рекомендации*, Москва (1983).
2. А. С. Канамян, В. П. Акопян, А. В. Топчян и др., *Мед. наука Армении*, № 3, 9 – 16 (1998).
3. Р. С. Мирзоян, Н. А. Хайлов, Т. С. Ганьшина, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **73**(5), 2 – 7 (2010).
4. Д. В. Сергеев, М. А. Домашенко, М. А. Пирадов, *Журн. неврол. и психиатр.*, **4**, 86 – 91 (2017); doi: 10.17116/jnevro20171174186-91.

5. С. Б. Середенин, Ю. А. Бледнов, М. Л. Гордей и др., *Хим.-фарм. журн.*, **2**, 134 – 137 (1987).
6. С. Б. Середенин, М. В. Воронин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **72**(1), 3 – 11 (2009).
7. А. В. Топчян, Р. С. Мирзоян, М. Г. Баласанян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **59**(5), 62 – 64 (1996).
8. J. Cuevas, A. Behensky, W. Deng, C. Katnik, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **339**(1), 152 – 60 (2011).
9. C. Iadecola, J. Anrather, *Nature Neuroscience*, **14**(11), 1363 – 1368 (2011).
10. C. Katnik, A. Garsia, A. Behensky, et al., *Neurobiol. Dis.*, **62**, 354 – 364 (2014).
11. J. Li, L. Chen, F. Guo, X. Han, *Neural Plasticity*, Article ID 8856722, 9 pages (2020); doi: 10.1155/2020/885672.
12. G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition. Academic Press (2013).
13. S. B. Seredenin, T. A. Antipova, M. V. Voronin, et al., *Bul. Exp. Biol. Med.*, **148**(1), 42 – 44 (2009); doi: 10.1007/s10517-009-0624-x.
14. M. V. Voronin, I. A. Kadnikov, S. B. Seredenin, *Neurochemical Journal*, **13**, 49 – 56 (2019); doi: 10.1134/S1819712419010185.
15. Q. Yang, Q. Huang, Z. Hu, X. Tang, *Front. Neurosci.*, **13**, 1036 (2019); doi: 10.3389/fnins.2019.01036.

Поступила 30.12.20

NEUROPROTECTIVE ACTIVITY OF AFOBAZOLE IN ISCHEMIZED BRAIN

M. G. Balasanyan¹, A. S. Kanayan¹, H. V. Topchyan¹, and V. P. Hakobyan¹

¹ M. Heratsi Yerevan State Medical University, Koryun str. 2, 0025 Yerevan, Armenia

Morphological studies were used to evaluate the protective effect of afobazole on the experimental model of ischemic stroke caused by the middle cerebral artery occlusion (MCAO). It was found that afobazole injections at a dose of 5 mg/kg twice a day resulted in good safety of striopellidar system, the area of ischemic necrosis of the cortex was clearly limited and characterized by early reperfusion and good preservation of neurocytes of basal and hypothalamic nuclei, and decreased the severity of hypoxic damage to neurocytes in the cortex of fields Cg1 and Cg2. Afobazole exhibited neuroprotective activity both after preliminary treatment and after its injection within therapeutic window (after 6-h MCAO), which was manifested by the elimination of subarachnoidal edema, preservation of neurocytes in the perifocal zone, and revascularization of the ischemic zone. Thus, the obtained results demonstrated a pronounced neuroprotective activity of afobazole in ischemized brain.

Keywords: afobazole; cerebral local ischemia; morphological changes; neuroprotection.