

ТИХОНОВИЧ М. В.¹, ГАВРИЛОВА С. А.¹,
ТАРАТИН Д. В.¹, ЛЕОНЕНКО И. В.^{1,2},
ПАРНЕС Е. Я.³

Ингибирование циклооксигеназ уменьшает размер некроза и гибель нейронов в коре головного мозга крыс с ишемическим инсультом и инсультом, осложненным реперфузией сонных артерий

¹ Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

² Медико-биологический факультет Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н. И. Пирогова, Москва

³ Центральная клиническая больница гражданской авиации, Москва
e-mail: marina.tikhonovich@gmail.ru

Реферат

Исследовали нейропротекторное действие нестероидного противовоспалительного препарата «Лорноксикам» у крыс с моделью ишемического инсульта (ОСМА) и инсульта, осложненного реперфузионным повреждением (ОСМА+ИР). В первом случае необратимо коагулировали среднюю мозговую артерию и лобную вену; во втором одновременно с ОСМА пережимали две сонные артерии, через час их реперфузировали. «Лорноксикам» вводили внутривенно через 20 мин от начала ишемии и через 24 и 72 часа после операции внутрибрюшинно в дозе, рекомендованной для людей, — 230 мкг/кг. Изучение возможного защитного действия препарата на микроскопическом уровне проводили через 28 суток после ОСМА, в каждой экспериментальной группе N=3. Обнаружили три основных морфологических эффекта «Лорноксикама»: 1) через трое суток после операции снизил размер некроза коры головного мозга крыс с ОСМА и в модели ОСМА+ИР на 25 - 40 %; 2) через 28 суток после операции существенно снизил величину нейроглиального показателя за счет увеличения числа выживших нейронов в области пенумбры; 3) существенно увеличил объем ядер нейронов у животных с инсультом.

Ключевые слова: мозг, ишемия, реперфузия, нейропротекция, «Лорноксикам».

Tikhonovich M. V.¹, Gavrilova S. A.¹, Taratin I. V.¹,
Leonenko I. V.^{1,2}, Parnes E. I.³

Inhibition of COX reduces the size of necrosis and death of neurons in the cerebral cortex of rats with ischemic insult and insult complicated with reperfusion of carotid arteries

¹ Faculty of Basic Medicine, M. V. Lomonosov Moscow State University

² Faculty of Bio-Medicine, The Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, Moscow

³ Central Hospital of Civil Aviation, Moscow
e-mail: marina.tikhonovich@gmail.ru

Abstract

The work addresses neuroprotectoral action of Lornoxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug, on rats with modeled ischemic insult (OMCA) and ischemic insult complicated with reperfusion injury (OMCA+RI). In the first case we irreversibly coagulated the medial cerebral artery and the frontal vein; in the latter case two carotid arteries were clamped in addition to OMCA and reperfused in one hour. Lornoxicam was injected intravenously 20 minutes after the beginning of ischemia and intra-abdominally 24 and 72 hours later. A dosage of 230 µg/kg recommended for humans was used. Possible protective action of the drug was studied 28 days after OMCA in each experimental group of N=3 species. We have observed three main morphological effects of Lornoxicam: 1) Lornoxicam induced 25 – 40 % reduction of cerebral cortex necrosis size both for rats with OMCA and with OMCA+RI; 2) neuroglial index was significantly reduced in 28 days after the surgery due to increase in number of survived neurons in the penumbra area; 3) the volume of neuron nuclei significantly increased for animals with insult.

Keywords: brain, ischemia, reperfusion, neuroprotection, lornoxicam.

Введение

В России каждый год более чем у 400 тысяч людей возникают острые церебральные нарушения кровообращения, три четверти из которых приходится на долю ишемического инсульта [3]. Примерно 35% заболевших умирает, около 20 % возвращается к труду, а большая часть становится инвалидами. Смертность от инсультов в России — одна из наиболее высоких в мире [5].

Уровень церебрального кровотока определяет степень повреждения ткани мозга во время развития ишемического инсульта: в зоне снижения кровоснабжения ниже 20 мл на 100 г/мин нарушения энергетического обмена необратимы и приводят к формированию некроза ткани головного мозга — «ядра ишемии» [4].

При церебральном кровотоке ниже 35 мл на 100 г/мин формируется область динамических изменений метаболизма, «ишемическая полутень», в течение 3–6 часов существования пенумбры в ней отсутствуют морфологические изменения. При сохранении сниженного мозгового кровотока в результате изменения метаболизма клеток головного мозга, повышения синтеза NO, развития оксидантного стресса и реакции местного воспаления, микроваскулярных нарушений происходит гибель клеток в области пенумбры, что приводит к расширению поражения [21]. Как правило, через 48–56 часов процесс формирования инфаркта завершен [4, 7].

Эффективных способов влияния на зону некроза головного мозга и исходы заболевания при развитии ишемического инсульта в настоящее время не найдено. Во время «терапевтического окна» — до 6 часов от начала появления симптомов — стремятся восстановить кровоток по мозговым артериям в области ишемии для обеспечения сохранности нервной ткани.

Рекомендации Европейского общества неврологов 2008 г. направлены на обеспечение организации реперфузионных мероприятий в кратчайшие сроки от начала неврологической симптоматики [15].

Во время ишемии основными провокаторами гибели клеток по пути некроза и апоптоза служат нарушение клеточного метаболизма, дополнительный выброс возбуждающих аминокислот, кальциевая перегрузка, потеря ионных градиентов, окислительный стресс. Особое место отводят развитию воспаления. В мозге этот процесс организован сложно, наряду с биосинтезом провоспалительных факторов, активирующих воспалительный ответ организма, происходит активация элементов собственного иммунитета, астроцитов [3, 13]. Во время реперфузии, когда доступ оксигенированной крови в ранее ишемизированный регион открыт, к этим факторам добавляются свободнорадикальное окисление и глобализация воспаления [18].

Таким образом, некроз развивается в любом случае, при ишемии или успешной реперфузии, и воспаление оказывается одним из ключевых факторов разрастания поражения. Система простагландинов в проблемной области активируется одной из первых и запускает биосинтез провоспалительных регуля-

торов: цитокинов, провоспалительной NO-синтазы, молекул адгезии, ростовых факторов и др [23]. Мы предположили, что блокирование основного фермента, участвующего в продукции простагландинов, — циклооксигеназы (ЦОГ), в ранние часы развития ишемического инсульта перед восстановлением кровотока в связанной с инфарктом мозговой артерии уменьшит зону некроза и повлияет на морфологические характеристики области бывшей пенумбры. В качестве блокатора использовали «Лорноксикам». «Лорноксикам» неселективно ингибирует обе изоформы ЦОГ, ЦОГ-1 и ЦОГ-2, выраженно снижает гиперпродукцию провоспалительной NO-синтазы, уменьшает биосинтез провоспалительных цитокинов, улучшает микроциркуляцию [10, 19]. Применение «Лорноксикама» у больных с сердечно-сосудистыми патологиями не выявило обычных для этого класса препаратов осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы [8]. Этими свойствами обоснован выбор препарата.

Материал и методы исследования

Эксперименты проводили на самках крыс популяции *Rattus norvegicus* весом 175–228 г. Животных содержали в условиях вивария со световым режимом 12 часов — день, 12 часов — ночь со свободным доступом к воде и пище. Самок крыс стандартизировали по фазам эстрального цикла, оперировали на стадии проэструс. В фазу проэструс концентрация прогестерона резко возрастает, а эстрадиола — падает, реакции воспаления в организме самки протекают активно. В эту фазу эстрального цикла женский организм наиболее уязвим [11].

Моделирование фокального инсульта проводили под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг внутривенно) по двум протоколам. В первом случае необратимо коагулировали среднюю мозговую артерию проксимальнее места ее бифуркации на фронтальную и парietальную ветви (ОСМА) и лобную вену. Для стабилизации очага поражения одновременно необратимо перевязывали ипсилатеральную общую сонную артерию [12]. Во втором протоколе выполняли ОСМА и одновременно пережимали обе общие сонные артерии. Через час от начала ишемии проводили реперфузию сонных артерий (ИР). Во втором протоколе образуется очаг необратимой ишемии; остальной мозг, особенно пенумбра, подвергается дополнительной ишемии за счет снижения общего кровоснабжения мозга, а в последующем — реперфузии, то есть эта модель осложнена диффузным реперфузионным повреждением мозга. Через 72 часа после операции животных подвергали эвтаназии.

Объем поражения определяли планиметрически в срезах мозга толщиной 1,5 мм, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ, 0,5 %-й раствор на 0,1 М фосфатном буфере, pH = 7,4) [9]. Живая ткань мозга окрашена красным цветом, некроз выглядит белесым. В программе «AUC1» рассчитывали размер пораженной области по отношению к общему размеру коры головного мозга этого полушария во всех срезах с двух сторон.

«Лорноксикам» вводили через 20 мин от начала ишемии внутривенно и через 24 и 72 часа после операции внутрибрюшинно в дозе, рекомендованной для людей, — 230 мкг/кг. Контрольные крысы получали инъекцию воды для инъекций в эквивалентном объеме.

Изучение возможного защитного действия препарата на микроскопическом уровне проводили через 28 суток после ОСМА, в каждой экспериментальной группе N=3.

Гистологические исследования. Область мозга, содержащую визуально определяемый глиальный рубец, фиксировали в смеси Карнуа, заключали в парафин, раскладывали на срезы толщиной 7 мкм, окрашивали крезильовым фиолетовым по Нислю по стандартным методикам.

Подсчет числа нервных и глиальных клеток, включая астроциты и олигодендроциты, проводили в перифокальной зоне очага поражения, в V слое сенсомоторной области коры головного мозга крыс с использованием программы «ImageJ». У контрольных животных исследовали гомотипичную область левого полушария. Для адекватности сопоставления результатов у опытных и контрольных животных плотность расположения нервных и глиальных клеток определяли в одинаковых по размеру полях зрения — 0,087 мм². Подсчет проводили на 6–9 срезах мозга (по 1–2 поля зрения со среза). Для определения нейроглиального показателя, характеризующего соотношение нейроглии и нейронов, число первых делили на число вторых. Для оценки размера ядер измеряли продольный и поперечный диаметр ядер в тех же полях зрения, по 100 ядер от каждого животного. Объем рассчитывали по формуле:

$V = 1/6 \times \pi \times B \times L^2$, где B — больший, а L — меньший диаметры [1].

Экспериментальные группы:

- 1) К — интактный контроль;
- 2) ОСМА+Д — необратимая ишемия с введением воды для инъекций;
- 3) ОСМА+Л — необратимая ишемия с введением «Лорноксикама»;
- 4) ОСМА+ИР+Д — необратимая ишемия, осложненная ишемией двух сонных артерий, в течение 1 часа с последующей реперфузией и введением воды для инъекций;

5) ОСМА+ИР+Л — необратимая ишемия, осложненная ишемией двух сонных артерий, в течение 1 часа с последующей реперфузией и введением «Лорноксикама».

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли в пакете программ «SPSS», version 10 и «STATISTICA», version 6, StatSoft, Inc. (2001). Результат представлен в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Различия между группами оценивали в сериях с моделированием фокального инсульта непараметрическим критерием Манна–Уитни, в экспериментах с моделированием неполной глобальной ишемии мозга использовали многомерный дисперсионный анализ (MANOVA) для межгрупповых сравнений. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние «Лорноксикама» на размер некроза коры головного мозга крыс с ишемическим инсультом.

В таблице 1 показан результат оценки размера поражения коры головного мозга у крыс с необратимой ишемией и ишемией, осложненной реперфузией двух сонных артерий. В первом случае ОСМА приводила к формированию некроза объемом 12,1 % от общего объема коры полушария. Во втором случае контрольная группа распалась на две подгруппы, кластерный анализ позволил корректно разделить животных на группу с малым, 8,2 %, и большим, 18,4 %, размером повреждения. «Лорноксикам», примененный в острую стадию развития инсульта в дозе, рекомендованной для людей, выраженно снижал поражение в группе ОСМА на 26 % по сравнению с контролем и в группе с реперфузией и малым размером некроза на 40 %; на размер некроза у крыс с реперфузией двух сонных артерий и большим поражением «Лорноксикам» не повлиял.

Влияние «Лорноксикама» на выживаемость и объем ядер нейронов в перифокальной области очага поражения коры головного мозга крыс с ишемическим инсультом. Результат морфометрического анализа срезов коры головного мозга крысы после моделирования ишемического инсульта представлен в таблице 2 и на микрофотографиях — рис. 1. Количество нейронов и нейроглиальных клеток подсчитывали в области пятого слоя коры в перифокальной

Объем очага поражения к объему коры полушария у крыс с необратимой ОСМА и с ОСМА, осложненной ишемией в течение 1 часа, двух сонных артерий с их последующей реперфузией в течение 72 часов (ОСМА+ИР) (%)

Таблица 1

Вводимый препарат	СМА, размер некроза	ОСМА + ИР	
		Малый размер поражения	Большой размер поражения
Вода для инъекций	12,1±4,9	8,2±1,6	18,4±2,2
«Лорноксикам»	9,0±3,3*	4,9±1,9*	19,6±6,0

* — статистически значимые отличия между экспериментальной группой и собственным контролем с вероятностью $p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни.

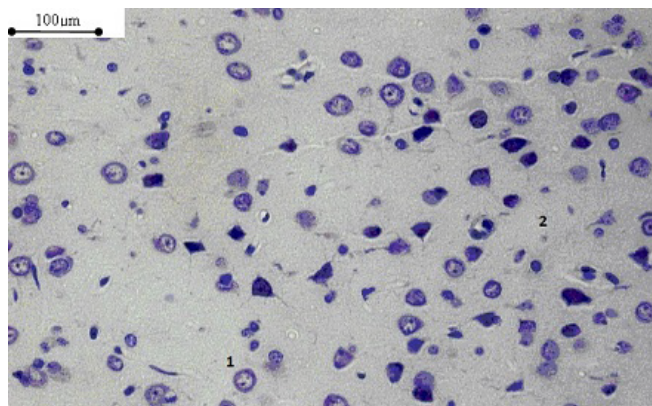


Рис. 1. Микрофотография срезов левого полушария мозга в районе перифокальной зоны глиального рубца при увеличении $\times 40$; 1 — нейрон, 2 — клетка нейроглии

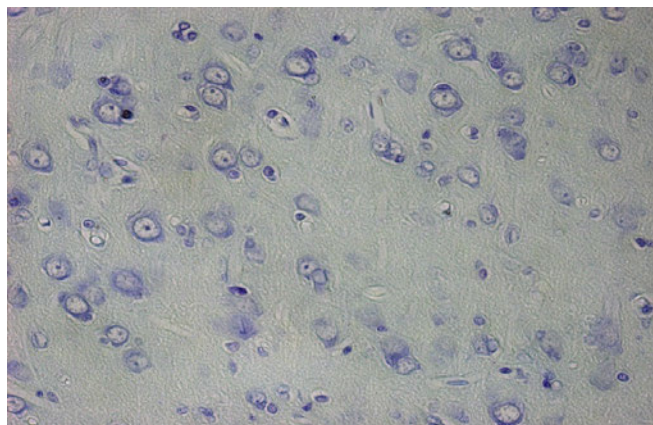


Рис. 2. Гомотипичная область коры в группе И-Д

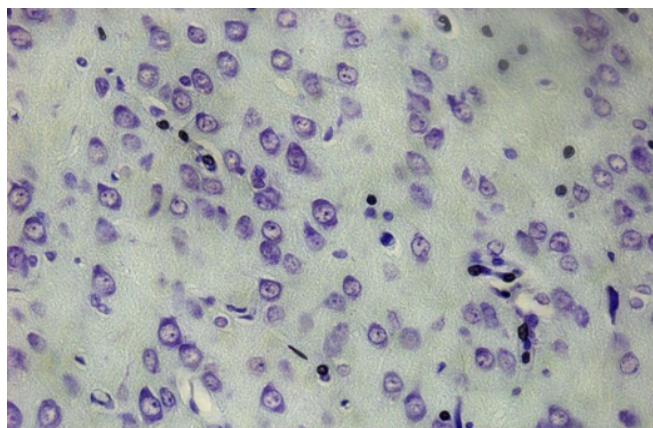


Рис. 3. Гомотипичная область коры в группе И-Л

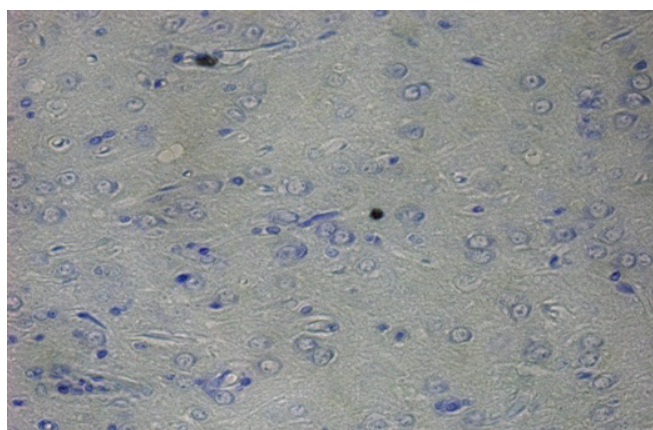


Рис. 4. Гомотипичная область коры в группе ИР-Д

зоне очага поражения, на границе глиального рубца, формирующегося в результате деления астроцитов и биосинтеза ими белков, заполняющих регион плавания нервной ткани.

У интактных животных нейроглиальный показатель в гомотипичной области коры головного мозга левого полушария составил 0,65 глиальной клетки на один нейрон. Необратимая ишемия привела более чем к двукратному увеличению ($p < 0,01$) этого параметра через 28 суток после ОСМА. «Лорноксикам» статистически значимо ($p < 0,05$) снизил величину нейроглиального показателя на 5 % по сравнению с группой ОСМА+Д. В группе животных с ОСМА, осложненной ишемией двух сонных артерий в течение часа с последующей их реперфузией, нейроглиальный показатель был равен 1,2 глиальной клетки на нейрон (рис. 1), существенно ниже — на 23 %, чем в группе ОСМА+Д ($p < 0,01$). Эффект Лорноксикама в этой модели выражен ярче, чем при необратимой ОСМА, нейроглиальный показатель в группе ОСМА+ИР+Л на 25 % ниже по сравнению с группой ОСМА+ИР+Д ($p < 0,01$) (табл. 2).

Если подробно рассмотреть результат, приведенный в таблице 2, видно, что двукратное увеличение нейроглиального показателя после моделирования ишемического инсульта обусловлено уменьшением числа выживших нейронов в 1,4 раза ($p < 0,01$) и увеличением количества глиальных клеток в 1,6 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактными крысами. Тенденция к увеличению числа выживших нейронов, но не изменение числа нейроглиальных клеток при применении «Лорноксикама» приводит к небольшому, но статистически значимому снижению нейроглиального показателя в этой модели ($p < 0,05$). При необратимой ОСМА, осложненной ишемией-реперфузией двух сонных артерий, закономерность сохраняется: в группе ОСМА+ИР+Л количество выживших нейронов было в 1,2 раза больше, чем в группе ОСМА+ИР+Д ($p < 0,01$), в то же время по количеству нейроглии различий не выявили.

В этом исследовании был обнаружен и морфометрически оценен интересный феномен — изменение объема ядер нейронов: объем ядер нейронов в перифокальной области очага ишемии через 28 суток после воздействия увеличен на 25–26 % в двух протоколах, в группах ОСМА+Д и ОСМА+ИР+Д, $p < 0,01$ (табл. 2; рис. 1). «Лорноксикам», примененный в острую стадию развития ишемии, через 28 суток после операции, увеличил объем ядер нейронов на 11 % в модели необратимой ишемии ($p < 0,05$) и на 15 % при ишемии, осложненной ишемией-реперфузией двух сонных артерий, $p < 0,01$ (табл. 2; рис. 1).

Обсуждение дизайна эксперимента. Для исследования нейропротекторных свойств неселективного блокатора ЦОГ, «Лорноксикама», использовали модификацию модели, предложенной Chen: дистальную необратимую окклюзию средней мозговой артерии. Высота коагуляции подобрана так, чтобы некроз располагался в лобно-теменной части коры и не затрагивал подкорковые структуры, в этом случае нет нарушений регуляции висцеральных функций и гибели животных. Для стабилизации размера некроза

необратимо перевязывали ипсилатеральную сонную артерию [12]. Формирующаяся зона ишемии отличается малой вариабельностью, высокой воспроизводимостью, объемом около 15 % от общего объема коры головного мозга оперированного полушария [9].

Пациенты с ишемическим инсультом, поступившие в стационар в первые шесть часов от начала развития неврологической симптоматики, являются кандидатами для проведения внутривенного тромболитического. Такой подход приводит к уменьшению поражения, увеличению выживаемости, снижению инвалидизации людей. Крайне актуально снизить реперфузионные повреждения и избежать осложнений после проведения тромболитической терапии.

В модели, осложненной реперфузионным повреждением, мы отказались от ишемии-реперфузии средней мозговой артерии по двум причинам.

Во-первых, нам хотелось сохранить ядро некроза для адекватной оценки размера поражения, во-вторых, из-за особенностей строения средней мозговой артерии при ее пережатии высока вероятность травмирования и невозможности тока крови по этому сосуду после окончания ишемии. Ишемия двух сонных артерий в течение часа, которую мы проводили дополнительно к ОСМА, существенно снижает общее кровоснабжение мозга, особенно в области пенумбры.

Этого времени вполне достаточно, чтобы произошло изменение метаболизма клеток, накопились восстановительные эквиваленты, усилилось образование NO, инициировалось воспаление [13], то есть образовались предикторы реперфузионного повреждения. Время ишемии двух сонных артерий постарались приблизить к клиническим условиям, но не делали слишком большим потому, что, как и у пациентов, оно работает против организма: чем длиннее этот период, тем катастрофичнее для животного окажется неспецифическое диффузное повреждение мозга.

Поскольку реакция организма на дополнительное повреждающее действие индивидуальна, в этой модели контрольные животные четко разделились на две группы: с большим и малым повреждением головного мозга, и статистическую оценку данных проводили, используя кластерный анализ. Через 72

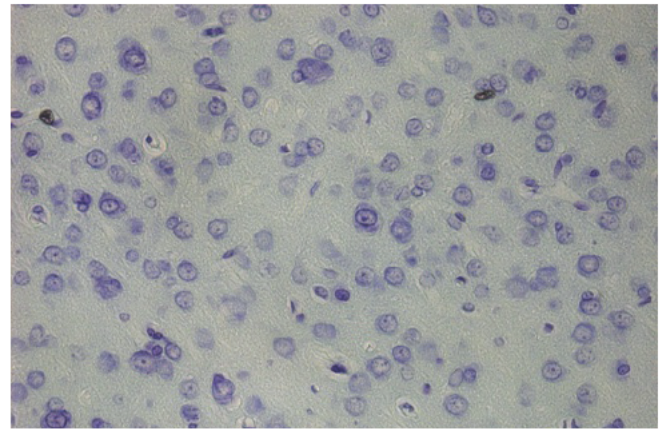


Рис. 5. Гомотипичная область коры в группе ИР-Л

часа после ОСМА, когда полное формирование очага поражения у крыс завершено, оценивали размер некроза [4].

Известно, что активация воспаления сопровождается развитием ишемии и вносит существенный вклад в реперфузионное повреждение. В мозге воспалительная реакция развивается по более сложному сценарию, чем, например, в сердце или при заживлении ран, ввиду того, что этот орган содержит элементы собственной иммунной системы, а увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера привлекает в проблемную зону лейкоциты и организует весь организм на борьбу с повреждением. Избыточная активация воспаления может быть причиной и дополнительной гибели нейронов, и отека мозга, и невозможности кровотока при реперфузионных мероприятиях.

В этом исследовании блокировали продукцию ранних организаторов воспаления — простагландинов. Для этого внутривенно в дозе, рекомендованной для людей, через 20 минут после окклюзии артерии и через каждые 24 часа в течение 3 дней после вводили неселективный ингибитор циклооксигеназ 1 и 2 типов «Лорноксикам». Во время развития воспаления выявляют два пика повышения экспрессии ЦОГ-2. Первый пик, примерно через 2 часа от начала ишемии, приводит к увеличению количества лейкоцитов в зоне поражения и повышению продукции ПГЕ2. Второй пик, через 48 часов, приводит в основном к

Влияние «Лорноксикама» на число нейронов, нейроглиальных клеток, величину нейроглиального показателя и размер ядер нейронов у крыс в V слое премоторной коры головного мозга в области пенумбры, окружающей инфаркт, через 28 суток после необратимой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) или ишемии, осложненной ишемией-реперфузией двух сонных артерий (ОСМА+ИР)

Таблица 2

Группа	Число нейронов (А)	Число клеток нейроглии (Б)	Нейроглиальный показатель (Б/А)	Объем ядер нейронов, мкм ³
Контроль (К)	58,3±15,2	35,7±7,5	0,65±0,24	23436,6±2390
ОСМА+Д	40,6±8,2 **	57,8±18,6 **	1,50±0,60 **	29503,6±4083 **
ОСМА+Л	43,9±18,1	56,9±15,9	1,43±0,44 #	32722,6±3136 #
ОСМА+ИР+Д	43,4±14,3 **,##	47,2±11,5 **	1,16±0,58 **,##	29288,1±3229 **
ОСМА+ИР+Л	53,9±14,6 ††	44,4±11,7	0,87±0,30 ††	33675,0±1357 ††

** — p<0,01 отличие от К; ## — p<0,01 отличие от ОСМА+Д; # — p<0,05 отличие от ОСМА+Д; †† — p<0,01 отличие от ОСМА+ИР.

синтезу ПГД₂ и вазоконстрикции. Использование блокаторов ЦОГ через 20 минут и между 24 и 48 часами после операции подавляет эти пики. Через 4–6 часов после ишемии астроциты становятся гипертрофированными и принимают амeboидную форму, что характерно для активации микроглии. Через 24 часа после окклюзии артерии происходит активация микроглии уже в зоне пенумбры [13]. Если учесть, что одними из самых ранних регуляторов воспаления и боли являются простагландины, закономерно использование ингибиторов циклооксигеназы именно при инициации воспаления, то есть в острую стадию. Безусловно, ЦОГ-2 играет более важную роль в развитии воспаления, но было доказано, что наличие ЦОГ-1 также необходимо. Поэтому нашей целью являлось подавление активности обеих изоформ ЦОГ, с некоторым преимуществом ЦОГ-2. «Лорноксикам» был выбран потому, что, ингибируя обе изоформы циклооксигеназы, обладает высокими анальгетическими и противовоспалительными эффектами. Важно, что этот препарат в течение месяца терапии больных ревматоидным артритом, осложненным артериальной гипертензией, не вызывал обычных для НПВС осложнений, снижал артериальное давление, частоту сердечных сокращений, улучшал вариабельность сердечного ритма [8].

Влияние введения «Лорноксикама» в острую стадию ишемии на выживаемость нейронов в области, окружающей бывший очаг некроза, области пенумбры, изучали через 28 суток после моделирования инсульта. В этот срок активные процессы в мозге завершены: завершено воспаление и полностью сформирован глиальный рубец, поэтому по результату можно судить о защитном действии препарата на нейроны и ремоделирование ткани в целом. Общепринятой мерой выживания нейронов и их функциональной активности служит нейроглиальный показатель — число глиальных клеток, приходящихся на нейрон [2].

Обсуждение результатов. Многими исследованиями показано, что провокация воспаления способствует разрастанию зоны поражения, а ингибирование разных звеньев воспалительной реакции снижает повреждение ткани при ишемии. «Лорноксикам», примененный в острую стадию развития инсульта в дозе, рекомендованной для людей, — 230 мкг/кг, ожидаемо уменьшил зону некроза как у животных с необратимой ОСМА, так и с ОСМА, осложненной ишемией-реперфузией сонных артерий, в группе с малым поражением. Положительный эффект препарата может быть связан с блокированием продукции простагландинов и, как следствие, снижением биосинтеза провоспалительных цитокинов, уменьшением активации иммуннокомпетентных клеток [14, 17, 20], уменьшения их инфильтрации в зону ишемии, снижением биосинтеза агрессивных молекул, уменьшением разрастания зоны некроза [16]. Причем положительный эффект препарата ярче в модели, осложненной ишемией-реперфузией.

События в очаге ишемии и реперфузии хорошо описаны Гусевым Е. И. и Скворцовой В. И. (2001). Необратимая окклюзия артерии приводит к образо-

ванию ишемизированного региона с ядерной областью, где кровоснабжение практически отсутствует и быстро формируется некроз. Ядро ишемии окружено пенумброй, областью с частично сохранным кровотоком за счет сосудов других регионов. Пережимая обе сонные артерии, мы ситуацию ухудшали, снижая уровень кровоснабжения в этих областях мозга более чем на 50–90 % (неопубликованные данные, полученные методом лазерной доплеровской флоу-риметрии, на кафедре физиологии и общей патологии ГУНУ ФФМ МГУ).

В области пенумбры, скорее всего, эти значения будут еще ниже. Во время ишемии изменяется метаболизм нейронов, происходит закисление среды, продуцируются белки раннего реагирования, синтезируются организаторы воспалительной реакции — простагландины и цитокины появляются в проблемной области одними из первых. Реперфузия сонных артерий вносит в область пенумбры элементы реперфузионного повреждения. Нужно учитывать, что без использования дополнительной терапии и антикоагулянтов, как в нашем эксперименте, результат реперфузии может быть различным: спазм сонной артерии или образование тромбов в месте пережатия артерий, отек тканей могут быть причиной невосстановления кровотока или дополнительного повреждения; или реперфузия может состояться в полном объеме. Поэтому контрольная группа с ОСМА, осложненной ишемией-реперфузией сонных артерий, распалась на две — с малым и большим некрозом. «Лорноксикам» не уменьшил размер большого некроза, но и не ухудшил ситуацию. В группе с меньшим размером поражения готовность ткани к развитию воспаления и возникновение феномена шикарной перфузии [4] приводят к «размыванию» воспаления по пенумбре, возможно, с частичным захватом ядерной зоны. В этих условиях «Лорноксикам», примененный в острую стадию развития инсульта, значительно, почти в два раза, снижает повреждение, эффект существенно больше, чем просто при необратимой ОСМА, когда воспаление медленно продвигается от границ проблемной области в центр ядра для ликвидации разрушений с последующей репарацией ткани.

На следующем этапе исследования важно было понять, оказывает ли «Лорноксикам» нейропротекторный эффект, то есть, увеличивает ли выживаемость нейронов в пограничной от глиального рубца области. Моделирование фокального ишемического инсульта вызвало двукратное увеличение нейроглиального показателя по сравнению со значением этого параметра в аналогичной области мозга у интактных животных, как из-за увеличения количества нейроглии, так и за счет уменьшения числа нейронов в зоне «полутени». С одной стороны, астроциты, формирующие глиальный рубец и выполняющие опорную функцию, заполняют пустоты, образовавшиеся в результате гибели нейронов [24], с другой — препятствуют росту нервных окончаний, установлению контакта между нервными клетками. Получается, что сдвиг нейроглиального показателя в сторону увеличения числа глии имеет серьезные

негативные последствия для ремоделирования поврежденной ткани.

Интересно, что реперфузия сместила нейроглиальный показатель в сторону контрольных значений. Эффект может быть связан с усилением общего кровоснабжения мозга после часовой ишемии, возможно, что этот эффект затронул и область пенумбры [4]. Защитный эффект «Лорноксикама» в моделях ишемии и ишемии, осложненной реперфузией сонных артерий, через трое суток после операции выражался в снижении размера поражения, через 28 суток — в сохранности большего количества нейронов на границе глиального рубца. Эффект препарата в модели с реперфузией выражен сильнее, возможно, потому, что в этой модели более генерализованно развивается воспаление, а значит, эта реакция может быть ингибирована с более выраженным положительным эффектом. Изменение нейроглиального показателя в сторону лучшего выживания нейронов может быть результатом как непосредственного действия «Лорноксикама» на клетки мозга, так и за счет снижения провоспалительных факторов в зоне пенумбры, в частности, из-за снижения генерации NO индуцибельной NO-синтазой и уменьшения образования пероксинитрита. Из полученного результата следует, что действие «Лорноксикама» прямо или косвенно направлено на защиту клеток в области пенумбры и препятствует увеличению размера инфаркта.

В исследовании было зрительно заметно, что ядра нейронов в группах, получавших «Лорноксикам»,

крупнее, чем у контрольных животных. Морфометрическая оценка размеров ядер показала, что перенесенная ишемия сама вызывает их увеличение, а препарат еще больше увеличивает этот показатель. В литературе нами не обнаружено данных об изменении объемов ядер выживших после ишемии и ишемии-реперфузии нейронов, поэтому сам факт обнаружения этого феномена интересен и может быть физиологически важным. В клетках мозга, имеющих отношение к продукции гормонов, изменение объема ядра связывают с изменением их секреторной активности [6]. Уменьшение размера ядер нейронов обнаруживают в нейронах крыс с принудительно выработанным алкоголизмом и у людей-алкоголиков, и рассматривают этот факт как отрицательный, то есть ставящий клетки на тропу гибели [22].

Заключение

Ингибирование биосинтеза простагландинов в острую стадию ишемии и ишемии, осложненной реперфузионным повреждением, неселективным ингибитором ЦОГ первого и второго типа — «Лорноксикамом» — приводит к уменьшению размера некроза, к увеличению выживания нейронов в V слое коры головного мозга на границе с глиальным рубцом и к укрупнению ядер нейронов. Эффекты ярче выражены в группе с дополнительным реперфузионным повреждением.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01974-А.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. М.: Медицина, 1980.
2. Блинков С.М., Глезер И.И. Мозг человека в цифрах и таблицах. Л.: Медицина. 1964.
3. Верещагин Н.В., Суслина З.А. Инсульт в зеркале медицины и общества. Вестник РАМН. 2003; 11: 48-50.
4. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М: Медицина, 2001.
5. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. Проблема инсульта в Российской Федерации: время активных совместных действий. Журн. неврол. и психиатр. им. С.С.Корсакова. 2007; 107(6): 4-10.
6. Попов С.С., Должанов А.Я., Зуев В.Г. Глионейрональный комплекс крупноклеточных ядер гипоталамуса при 5-месячном воздействии импульсного электромагнитного излучения интенсивности. Журн. практической и теоретической биологии и медицины. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2004; 3(1): 71-74.
7. Скворцова В.И. Реперфузионная терапия ишемического инсульта. Consilium medicum. 2004; 6(8).
8. Цурко В.В., Парнес Е.Я., Красносельский М.Я. Оценка клинической эффективности ксефокама и его влияния на артериальное давление и вариабельность сердечного ритма у больных ревматоидным артритом в сочетании с артериальной гипертензией. Терапевтический архив. 2002; 5: 633-66.
9. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M., et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke. 1986; 17: 472-476.
10. Berg J., Christoph T., Widerna M., et al. Isoenzyme-specific cyclooxygenase inhibitors: a whole cell assay system using the human erythroleukemic cell line HEL and the human monocytic cell line Mono Mac 6. J Pharmacol Toxicol Methods. 1997; 37(4): 179-86.
11. Baser U., Cekici A., Tanrikulu-Kucuk S., et al. Gingival inflammation and interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha levels in gingival crevicular fluid during the menstrual cycle. J Periodontol. 2009; 80(12): 1983-90.
12. Chen S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L. A model of focal ischemic stroke in the rat reproducible extensive cortical infarction. Stroke. 1989; 17(4): 738-743.
13. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A., et al. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Germany Trends Neurosci. 1999; 22(9): 391-7.
14. Dubois R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 1998; 12(12): 1063-73.
15. Ringleb P.A., Bousser M.G., Ford G., et al. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. Cerebrovasc Dis. 2008; 25(5):457-507. : 54-59.
16. Hansen P.R. Myocardial reperfusion injury: experimental evidence and clinical relevance. Eur Heart J. 1995; 16: 734 – 740.
17. Jones D.A., Carlton D.P., McIntyre T.M., et al. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. J Biol Chem. 1993; 268: 9049–9054.

18. Komotar R.J., Starke R.M., Arias E.J., et al. The complement cascade: new avenues in stroke therapy. *Curr Vasc Pharmacol.* 2009; 7(3): 287-92.

19. Pruss T.P., Stroissnig H., Radhofer-Welte S., et al. Overview of the pharmacological properties, pharmacokinetics and animal safety assessment of lornoxicam. *Postgrad Med J.* 1990; 66(4): 18-21.

20. Seibert K., Zhang Y., Leahy K., et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 12013–12017.

21. Tomita M., Fukuuchi Y., Terakawa S. *Acta Neurochir (Wien)* 1994; 1(60): 31-33.

22. Underwood M.D., Mann J.J., Arango V. Morphometry of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007; 31(5): 837-45.

23. Yuhki K., Kashiwagi H., Kojima F., et al. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int Angiol.* 2010; 29(2):19-27.

24. Yasuda Y., Tateishi N., Shimoda T., et al. Relationship between S100 β and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. *Brain Res.* 2004; 1021(1): 20-31.