

Влияние цитиколина на процессы нейрорегенерации в постинсультном восстановительном периоде

Несмотря на то что у большинства пациентов, перенесших инсульт, отмечается спонтанное функциональное улучшение, полное восстановление сенсорных и двигательных функций происходит редко. В связи с этим разработка терапевтических подходов, призванных стимулировать эндогенные процессы восстановления после инсульта, является одной из приоритетных задач неврологии.

Одним из препаратов с расширенным терапевтическим окном, который показан при ишемическом инсульте, является цитиколин. В настоящее время он проходит третий этап рандомизированных двойных слепых плацебо контролируемых мультицентровых клинических исследований (Intravenous Thrombolysis Plus Hypothermia for Acute Treatment of Ischemic Stroke – ICTUS). Несмотря на то что для цитиколина описаны множество положительных эффектов, точные механизмы действия этого препарата все еще остаются невыясненными.

Цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин, или CDP-холин) – естественное эндогенное соединение, играющее важную роль в биосинтезе фосфатидилхолина, которое показало нейропротекторные свойства при различных повреждениях ЦНС, в том числе при ишемии головного мозга (S. Sahin et al., 2010). Предположительными механизмами действия цитиколина являются предотвращение высвобождения жирных кислот, стимуляция синтеза фосфатидилхолина, сохранение уровня кардиолипина и сфингомиелина, повышение синтеза глутатиона и глутатионредуктазы, восстановление активности Na^+/K^+ -АТФ-азы, а также антиглутаматергический эффект (O. Hurtado et al., 2008). В дополнение к нейропротекторным свойствам цитиколин убедительно продемонстрировал нейрорегенераторную активность, хотя ее механизмы все еще не известны (O. Hurtado et al., 2007).

В данном исследовании, помимо изучения влияния цитиколина на долгосрочный функциональный исход заболевания, пристальное внимание уделялось нейрорегенераторному действию препарата в период постинсультного нейрогенеза в субвентрикулярной зоне, зубчатой извилине гиппокампа и перинфарктной зоне. Поскольку цитиколин проявляет мембраностабилизирующие свойства (A.M. Rao et al., 2000), проведено также изучение возможного влияния этого препарата на изменение количества рецепторов таких нейромедиаторов, как глутамат и гамма-аминомасляная кислоты типа А (GABA_A), в околоочаговых и удаленных областях, что может способствовать восстановлению поведенческой функции.

Материалы и методы

В экспериментах использовались 40 самцов крыс линии Вистар (Charles River, Sulzfeld, Germany) с начальным весом от 180 до 200 г. Животных расселили группами по 2 особи в клетках из поликарбонатного материала макролон и содержали в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха – 22 °С, 12-часовой цикл чередования света и темноты (свет включали в 7:00). Животные получали стандартное лабораторное питание и водопроводную воду до насыщения.

Модель тромботической ишемии. Все эксперименты проводились в соответствии с директивой Совета европейских сообществ от 24 ноября 1986 г. и экспериментальными протоколами, утвержденными местным комитетом по этике. Эксперименты проводились на взрослых особях крыс линии Вистар весом 270–310 г. Животным провели анестезию с помощью интраперитонеальной инъекции гидрохлорида кетамина (Ketanest, 100 мг/кг) и гидрохлорида ксизолина (8 мг/кг). Для инфузии бенгальского розового проведена катетеризация левой бедренной вены с помощью трубки PE-50. Ректальная температура поддерживалась на уровне 37 °С с помощью грелки с термостатом (Fohr Medical Instruments). В правой фронтальной коре головного мозга проведена индукция тромботической ишемии с помощью лазера. Пятно лазера (G Laser Technologies) диаметром 8 мм направляли на череп животных на 0,5 мм впереди от брегмы и на 3,5 мм латеральнее средней линии. Воздействие лазером проводилось в течение 20 мин. Во время первых 2 мин животным провели внутривенную инфузию красителя бенгальского розового (0,133 мл/кг, 10 мг/мл физиологического раствора). В ходе хирургических операций погибли 6 животных. После проведения операций всех животных перемаркировали для обеспечения условий слепого метода исследования.

Лечение. Грызунов случайным образом распределили в контрольную (n=17) и лечебную (n=17) группы. Животные лечебной и контрольной группы ежедневно получали инъекции цитиколина (100 мг/кг) и плацебо (физиологический раствор) соответственно на протяжении 10 дней подряд. Инъекции начали проводить через 24 ч после индукции тромботической ишемии. Для того чтобы пометить делящиеся клетки, в течение всего 10-дневного периода животные обеих групп также ежедневно получали инъекции бромдезоксипуридина (50 мг/кг/день интраперитонеально) за 1 ч до введения цитиколина или плацебо.

Тестирование поведенческой функции. Поведенческие эксперименты проводились на 34 животных (по 17 в каждой группе). Тест по удалению клейкой ленты и тест с цилиндром проводился у всех животных за 1 день до индукции ишемии после 3-дневного тренировочного периода, а также в 1-й, на 10-й, 21-й и 28-й день после ишемии исследователем, который не был информирован о групповой принадлежности животных.

Иммуногистохимическое исследование нейрогенеза. Для иммуногистохимического исследования нейрогенеза использовался головной мозг 14 грызунов (по 7 животных из каждой группы). Через 28 дней после ишемии животным провели повторную анестезию и транскардиальную перфузию 4% раствором параформальдегида в 0,1 моль/л фосфатного буфера. Головной мозг животных поместили на ночь в 4% раствор параформальдегида при температуре 4 °С. Затем в течение 3 дней проводили криопротекцию ткани в 30% растворе сахарозы и хранили при температуре -80 °С до проведения анализов. Иммуногистохимическое исследование проводили на сагиттальных свободно плавающих срезах толщиной 40 мкм со следующими антителами: крысиные анти-BrdU (1:500; Abcam), мышинные антитела к NeuN (1:200; Millipore), кроличьи антидаблкортин-антитела (1:500; Abcam).

BrdU/NeuN-позитивные клетки проанализированы в 3 участках мозга: зубчатой извилине гиппокампа, субвентрикулярной и перинфарктной зонах. В зубчатой извилине гиппокампа и субвентрикулярной зоне все BrdU-позитивные клетки подсчитаны в 7 срезах (каждый 12-й срез, интервалы 440 мкм) на каждое полушарие. Для анализа BrdU/NeuN-позитивных клеток в перинфарктной зоне 4 квадрата (300×300 мкм), примыкающих к этому участку, исследованы в 4 срезах (от 1 мм до -0,5 мм по отношению к брегме). Для определения доли нейронов среди новообразованных клеток 50 случайно отобранных BrdU-позитивных клеток из зубчатой извилины гиппокампа, субвентрикулярной и перинфарктной зон были проанализированы на BrdU/NeuN-совместимость. Путем умножения общего количества BrdU-позитивных клеток на содержание (в %) клеток, позитивных одновременно по BrdU и NeuN, удалось получить количество новообразованных нейронов в соответствующих участках мозга.

Подготовка тканей головного мозга для иммуногистохимического исследования и автордиографии. После декапитации головной мозг животных сразу же удалили и заморозили на 10 мин в изопентане при температуре -30 °С. В дальнейшем головной мозг животных хранили при температуре -80 °С до использования в исследовании. Головной мозг животных последовательно рассекали в криостате при температуре -20 °С в 12,72 мм от брегмы на корональные срезы толщиной 20 мкм, которые поместили в триэтоксисилильные слайды с пропиламиновым покрытием. Для анализа морфологии и объема тканей, затронутых инфарктом, использовались срезы из следующих интрауральных координат: 12.72, 10.72, 8.72, 6.72, 4.72 и 2.72. Иммуногистохимическое исследование, как и автордиография, проведены на срезах в зоне самого большого объема инфаркта коры головного мозга. Как правило, эти участки находились в хвостатом ядре либо передней комиссуры, а также на уровне дорсальной области гиппокампа.

Исследование тканей головного мозга. Проведено окрашивание гематоксилином и эозином в соответствии со стандартными протоколами. Срезы отсканировали в идентичных условиях освещения цифровой камерой CoolSNAP (Roper Scientific, Photometrics CoolSNAP™ cf, Ottobrunn/Munich, Германия) и оцифровали с помощью аналитической системы минимального клинически важного различия (MCID, Minimal clinically important difference, Imaging Research Inc, St Catharines, Ontario, Canada). Расстояние между последовательными корональными срезами использовалось в расчетах линейной интеграции поражения для определения объема поражения тканей. Исследователь, проводивший анализы, не знал о групповой принадлежности тканей головного мозга.

Анализ целостности дендритов, активности микроглии и формирования глиальных рубцов. Проведен иммуногистохимическим методом с последовательным использованием антител против белка, ассоциированного с микротрубочками (microtubule-associated protein 2), ионизированной кальцийсвязывающей молекулы (ionized calcium-binding adaptor molecule 1) и глиального фибриллярного кислого белка. Иммуноокрашенные срезы головного мозга на уровне зоны инфаркта отсканировали при увеличении ×2,5 с помощью микроскопа Leica (Leica, Германия), оцифровали и перенесли на компьютерный дисплей. Яркость, контрастность и коэффициент усиления оставались на постоянном уровне во время получения изображения. Глиальные рубцы и участки активированной микроглии, окружавшие пораженные ткани, разделили на две области: базальную область между пораженными тканями и мозолистым телом и латеральную область рубца. Латеральную область рубца, представляющую собой эквивалент непосредственной пограничной зоны, проверили на наличие иммунореактивности белка, ассоциированного с микротрубочками (рис. 1). Указанные области отметили на дисплее. Интересующие исследователей участки проанализированы с помощью денситометрии и MCID (Imaging Research Inc) по вышеописанной методике. Специалист, проводивший анализы, не был информирован о групповой принадлежности образцов тканей.

Автордиография in vitro.

Количественную рецепторную автордиографию провели с использованием ^3H МК-801, ^3H α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и ^3H мусцимола для маркировки рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA), AMPA и ГАМК-А соответственно. Лиганды приобретены в Perkin Elmer, Inc.

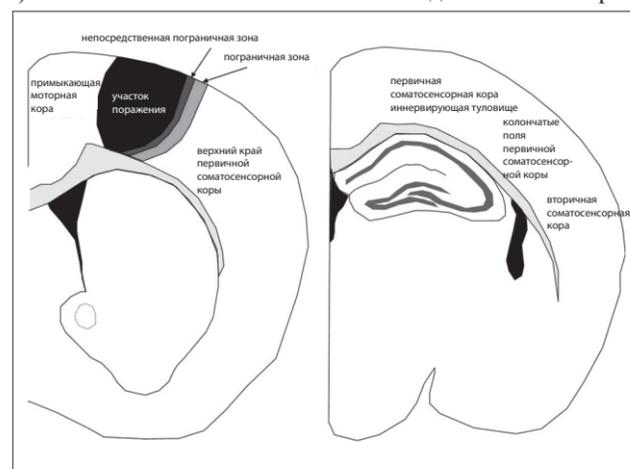


Рис. 1. Плотность рецепторного связывания на уровне наиболее широкого участка инфаркта мозга в непосредственной пограничной зоне, пограничной зоне, примыкающей моторной коре, удаленных участках верхнего края соматосенсорной коры и в соответствующих контралатеральных областях (на рисунке не показаны). Оценка плотности рецепторного связывания в колончатых полях и области иннервации туловища на уровне дорсальной части гиппокампа на стороне поражения и контралатерально (на рисунке не показано)

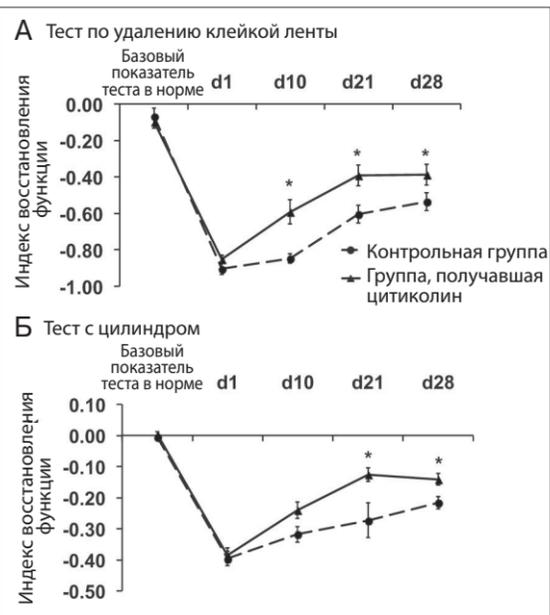


Рис. 2. Функциональные тесты. Степень восстановления соматосенсорной функции оценивалась с помощью теста по удалению клейкой ленты. У животных, получавших цитиколин, отмечались лучшие показатели восстановления соматосенсорной функции в сравнении с контрольной группой. Значительное улучшение по сравнению с контрольной группой отмечалось на 10-й и 28-й день после ишемии головного мозга (а). Степень восстановления моторной функции оценивалась с помощью теста с цилиндром. Значительные улучшения в моторной функции у животных, получавших цитиколин, по сравнению с контрольной группой наблюдались на 21-й и 28-й день после ишемии головного мозга (б)

Инкубационные и маркировочные процедуры в различных связующих участках проведены в соответствии с протоколами Zilles и соавт. по вышеописанной методике. Количественный анализ лигандрецепторных взаимодействий проведен в следующих областях: в латеральной перинфарктной зоне, включая непосредственную пограничную зону (латеральная тонкая окантовка вблизи поражения); в пограничной зоне; смежной двигательной коре; соответствующим областям контралатерального полушария; различных удаленных участках коры на стороне поражения и контралатерально, таких как верхний край первичной соматосенсорной коры (S1 upper lip), область иннервации туловища в соматосенсорной коре (S1 somatosensory cortex trunk region), колончатые поля, которые иннервируют вибриссы животных (S1 barrel fields), и вторичная соматосенсорная кора (S2). Интересующие участки отметили на дисплее, а невыразительные значения были автоматически проанализированы с помощью компьютерной программы для визуализации. Неспецифическое связывание находилось чуть

выше фоновых отметок или вообще не наблюдалось. Фоновая плотность использовалась для оценки оптической плотности неспецифического связывания. За счет вычитания оптической плотности неспецифического связывания из оптической плотности общего связывания было получено значение оптической плотности специфического связывания. Плотность специфического связывания в лечебной и контрольной группах проанализировали посредством подсчета средних концентраций каждого лиганда и участков связывания. Оптическая плотность обозначена в виде средних значений с учетом стандартного отклонения и выражена в процентах от показателей контрольной группы животных. Конечные значения привели в соответствие с показателями контрольных животных для каждого эксперимента по вышеописанной методике. Специалист, проводивший анализ, не был информирован о групповой принадлежности образцов.

Статистический анализ. Рандомизация осуществлялась с помощью программного обеспечения Research Randomizer (Version 3.0; Urbaniak GC, Plous S, 2011, retrieved on April 22, 2011). Значения, приведенные в данном исследовании, являются средним показателем с учетом стандартной погрешности измерений. Статистический анализ проведен с помощью программного обеспечения Statistical Package of Social Sciences (Version 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL). Данные оценивались с помощью графических гистограмм и верифицировались в тесте Шапиро-Уилка. Сенсомоторные изменения подвергли дисперсионному анализу. Для сравнения показателей в двух группах использовали t-критерий Стьюдента и коррекция Бонферрони. Уровень погрешности 0,05 был принят как критерий определения значимости.

Нормальное распределение данных исследования тканей головного мозга и рецепторной автордиографии верифицировано с помощью теста Шапиро-Уилка. Значительные групповые эффекты подвергли двухфакторному дисперсионному анализу и оценке с использованием критерия Фишера. Для проведения апостериорного анализа использовался t-критерий Стьюдента. Показатель вероятности 0,05 рассматривался как статистически значимый. Анализы проведены с помощью приложения Analyze-it для Microsoft Excel (Analyze-it Software, Ltd, Лидс, Великобритания). Все значения являются средними показателями с учетом стандартного отклонения и выражены в процентах от средних показателей в контрольной группе животных.

Результаты

Функциональный исход. Модель тромботического инсульта привела к различным видам нарушений соматосенсорной и моторной функций. В данном исследовании восстановление соматосенсорной и моторной функций оценивалось с помощью теста по удалению клейкой ленты и теста с цилиндром соответственно. У животных, получавших цитиколин, наблюдалось более благоприятное восстановление соматосенсорной функции по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе (рис. 2а). Этот эффект достиг наибольшей выраженности ($p < 0,05$, критерий Фишера и двухфакторный дисперсионный анализ) на 10-й день после индукции ишемии головного мозга и сохранялся до самого конца эксперимента (28 дней). Аналогичные показатели наблюдались при восстановлении моторной функции у животных, получавших цитиколин, по сравнению с грызунами контрольной группы (рис. 2б). Наиболее значимое преимущество в восстановлении моторной функции ($p < 0,05$, критерий Фишера и двухфакторный дисперсионный анализ) было достигнуто на 21-й день эксперимента и также сохранялось вплоть до 28-го дня.

Оценка процессов постинфарктного нейрогенеза. В ходе лабораторных анализов на 28-й день после ишемии головного мозга у животных, получавших цитиколин, обнаружилось существенное повышение количества новых нейронов в субвентрикулярной зоне, зубчатой извилине гиппокампа и перинфарктной зоне по сравнению с таковым в контрольной группе (рис. 3). Дальнейшие анализы показали существенное повышение количества BrdU-положительных клеток в зубчатой извилине гиппокампа ($161,07 \pm 36,96$ vs $67,25 \pm 16,48$) и субвентрикулярной зоне ($154,57 \pm 19,83$

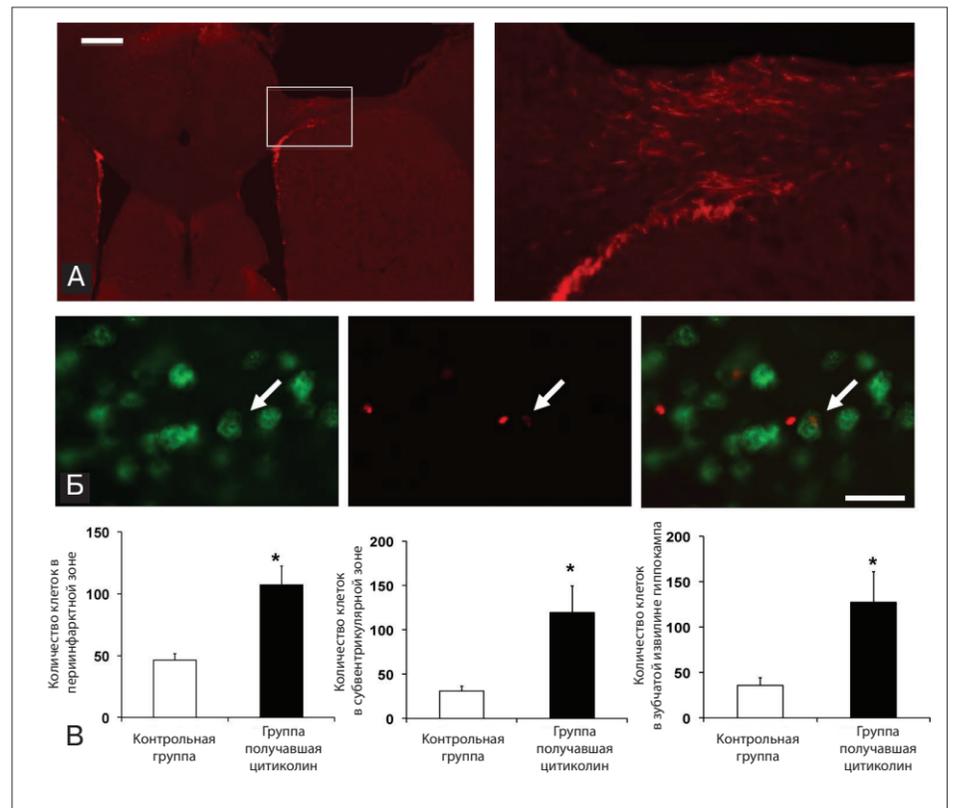


Рис. 3. Уровни миграции клеток-предшественников нейронов (дабкортин-позитивных клеток) на 28-й день эксперимента на примере микрофотографии со стороны поражения (слева) и увеличенного изображения (справа). Масштабная отметка соответствует 100 мкм (а). BrdU/NeuN-позитивные клетки на микрофотографии из перинфарктной зоны (слева направо: NeuN, BrdU и клетки, положительные по обоим факторам). Масштабная отметка соответствует 100 мкм (б). Диаграммы интенсивности процессов нейрогенеза в перинфарктной, субвентрикулярной зоне и зубчатой извилине гиппокампа соответственно (в)

vs $93,25 \pm 12,07$) у животных, получавших цитиколин, по сравнению с соответствующим показателем у грызунов в контрольной группе. В перинфарктной зоне у животных исследуемой группы не отмечено значительного повышения количества BrdU-положительных клеток по сравнению с контролем ($411,14 \pm 18,13$ vs $377,88 \pm 13,93$; коррекция Бонферрони, t-критерий Стьюдента; $p = 0,16$). Для исследования возможных нейронспецифических эффектов цитиколина проведен анализ доли BrdU/NeuN-позитивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа, субвентрикулярной и перинфарктной зонах. Применение цитиколина приводило к повышению доли BrdU/NeuN-позитивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа ($75 \pm 4,36$ vs $53,75 \pm 2,63\%$), субвентрикулярной ($70,71 \pm 6,12$ vs $51,25 \pm 3,75\%$) и перинфарктной зонах ($58,29 \pm 3,37$ vs $36,12 \pm 3,05\%$). Более того, иммуногистохимическое исследование визуализировало миграцию дабкортин-позитивных клеток-предшественников нейронов из субвентрикулярной в перинфарктную зону (рис. 3).

Исследование тканей головного мозга. Одно из 10 животных контрольной группы пришлось исключить из эксперимента в связи с отсутствием инфаркта головного мозга. Между исследуемой и контрольной группами не было значительных различий в общем объеме инфаркта головного мозга ($8,15 \pm 2,38$ vs $10,78 \pm 4,76$ мм³; $p = 0,154$). Объем ипсилатеральных и контралатеральных полушарий в исследуемой и контрольной группах значительно не отличался (контралатеральное: $341,80 \pm 20$ vs $350,57 \pm 11,62$ мм³ соответственно; $p = 0,258$; ипсилатеральное: $329,47 \pm 18,42$ vs $333,69 \pm 10,95$ мм³ соответственно; $p = 0,547$). Более того, анализ объема остаточной ткани головного мозга в ипсилатеральном полушарии не выявил значительных отличий у животных в исследуемой и контрольной группах ($321,31 \pm 16,92$ vs $322,91 \pm 10,37$ мм³ соответственно; $p = 0,804$).

Исследование целостности дендритов в перинфарктной зоне. Между контрольной (взятой за 100%) и исследуемой группами не выявлено существенных отличий в целостности дендритов в непосредственной пограничной зоне ($100,0 \pm 11,1$ vs $115,4 \pm 22,6\%$; $p = 0,082$).

Иммунореактивность ионизированных кальцийсвязывающих молекул в перинфарктной зоне. У животных в исследуемой группе наблюдалось значительное снижение иммунореактивности по сравнению с таковой у грызунов в контрольной группе (взятой за 100%) в латеральной зоне ($100,0 \pm 14,0$ vs $79,5 \pm 22,7\%$; $p = 0,032$). В базальной зоне снижение иммунореактивности в исследуемой группе не достигло уровня статистической значимости ($100,0 \pm 19,3$ vs $84,1 \pm 16,1\%$; $p = 0,067$).

Формирование рубцов в перинфарктной зоне. В контрольной (взятой за 100%) и исследуемой группах животных не выявлено значительных отличий в формировании глиальных рубцов как в базальной ($100,0 \pm 27,4$ vs $114,3 \pm 36,7\%$; $p = 0,353$), так и в латеральной зоне ($100,0 \pm 29,7$ vs $111,5 \pm 41,1\%$; $p = 0,909$).

Рецепторная автордиография in vitro

Связывание [³H]МК-801, [³H]АМРА, и [³H]мусцимола с NMDA, АМРА и GABA_A в перинфарктной зоне. Рецепторное связывание [³H]МК-801 в непосредственной пограничной зоне значительно возросло в исследуемой группе животных по сравнению с соответствующим показателем в контрольной ($p = 0,0338$). В пограничной зоне связывание [³H]МК-801 также возросло в исследуемой группе, но не было существенным. Аналогичные показатели роста в непосредственной пограничной зоне исследуемой группы животных наблюдались и для рецепторного связывания [³H]АМРА ($p = 0,0448$). В пограничной зоне также отмечался лишь незначительный рост рецепторного связывания [³H]АМРА. Однако уровень рецепторного связывания [³H]АМРА в контралатеральной коре (соответствующей пограничной зоне) у животных исследуемой группы значительно снизился по сравнению с таковым у грызунов контрольной группы. В перинфарктной зоне и соответствующей контралатеральной коре головного мозга не было значительных отличий в связывании [³H]мусцимола с ингибиторными ГАМК-А рецепторами в обеих группах животных (рис. 4).

Продолжение на стр. 36.

Влияние цитиколина на процессы нейрорегенерации в постинсультном восстановительном периоде

Продолжение. Начало на стр. 34.

Связывание [³H]МК-801, [³H]АМРА и [³H]мусцимола с NMDA, АМРА и GABA_A в прилегающей моторной коре. В исследуемой группе животных не было замечено значительных изменений плотности связывания [³H]МК-801 в моторной коре головного мозга. Тем не менее плотность связывания [³H]АМРА в моторной коре снижалась во всех слоях как на стороне поражения, так и контралатерально, но значительное снижение плотности наблюдалось только в IV слое ($p \pm 0,0167$; рис. 5, 6). К тому же назначение цитиколина привело к общему незначительному повышению плотности связывания [³H]мусцимола в моторной коре головного мозга исследуемой группы животных. И только в I слое моторной коры на стороне поражения наблюдалось существенное повышение плотности связывания [³H]мусцимола в исследуемой группе по сравнению с контрольной ($p=0,0171$).

Связывание рецепторов [³H]МК-801, [³H]АМРА и [³H]Muscimol с NMDA, АМРА, GABA_A в участках, удаленных от поражения

Верхний край первичной соматосенсорной коры. В обеих группах животных не было выявлено существенных отличий в уровнях рецепторного связывания [³H]МК-801 на стороне поражения. Значительное снижение указанного показателя в исследуемой группе наблюдалось только контралатерально в III слое верхнего края соматосенсорной коры ($p=0,0042$). Других существенных изменений рецепторного связывания [³H]МК-801 в контралатеральном полушарии не выявлено. В исследуемой группе животных рецепторное связывание [³H]АМРА в верхнем крае соматосенсорной коры значительно возросло на стороне поражения в I слое ($p=0,0151$). Однако во всех остальных слоях в этом показателе не было значительных изменений как на стороне поражения, так и контралатерально. В обеих группах животных уровень связывания [³H]мусцимола в верхнем крае соматосенсорной коры оказался практически идентичным во всех слоях на стороне поражения и контралатерально (рис. 5, 6).

Область иннервации туловища в соматосенсорной коре. В исследуемой группе плотность связывания [³H]МК-801 значительно снизилась только в IV слое контралатеральной соматосенсорной коры, иннервирующей туловище ($p=0,0386$). Существенных изменений данного показателя по сравнению с таковым в контрольной группе в других слоях как на стороне поражения, так и контралатерально выявлено не было ($p > 0,05$). Плотность [³H]АМРА-связывания незначительно снизилась в обоих полушариях у животных исследуемой группы, и только во II ($p=0,0248$) и в IV слоях ($p=0,0345$) наблюдалось значительное снижение плотности по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе. В обеих группах животных плотность связывания [³H]мусцимола значительно не отличалась.

Колончатые поля. В обеих группах животных не было зафиксировано значительных изменений плотности рецепторного связывания [³H]МК-801. Плотность рецепторного связывания [³H]АМРА в исследуемой группе снизилась в I и VI слоях обоих полушарий. Снижение плотности достигло значительного уровня во II (ипсилатерально, $p=0,0065$; контралатерально, $p=0,021$), в III (ипсилатерально, $p=0,0075$; контралатерально, $p=0,0123$), IV (ипсилатерально, $p=0,0241$; контралатерально, $p=0,0147$) и V (ипсилатерально, $p=0,0081$; контралатерально, $p=0,0082$) слоях по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе. Плотность рецепторного связывания [³H]мусцимола значительно возросла на стороне поражения в I слое ($p=0,0464$) исследуемой группы (рис. 5, 6).

Вторичная соматосенсорная кора. В то время как [³H]МК801-связывание в I и VI слоях обоих полушарий не претерпело значительных изменений

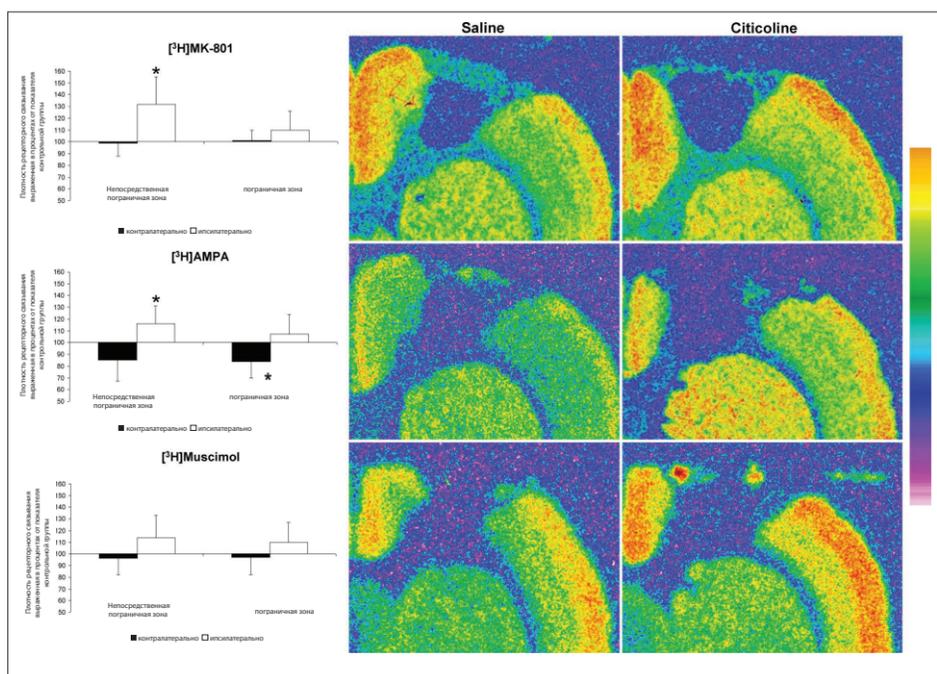


Рис. 4. Связывание рецепторов [³H]МК-801, [³H]АМРА и [³H]мусцимола с NMDA, АМРА, GABA_A в непосредственной пограничной зоне и пограничной зоне в исследуемой группе по сравнению с контрольной. Показатели контрольной группы представлены слева. Цветные автордиограммы сделаны на уровне наиболее широкого участка инфаркта мозга. Справа представлена цветовая шкала плотности связывания от низкого (розовый) до высокого (красный) уровня

под воздействием цитиколина, [³H]АМРА-связывание немного снизилось во всех слоях на стороне поражения и контралатерально. Существенное снижение [³H]АМРА-связывания наблюдалось в VI слое на стороне поражения ($p=0,0054$). Связывание [³H]мусцимола в исследуемой группе оставалось без изменений.

Обсуждение

Сосредоточив внимание на регенераторных свойствах цитиколина, в данном исследовании удалось продемонстрировать стабильное улучшение процесса восстановления сенсомоторной функции на 21-й и 28-й день после индуцирования ишемии головного мозга. К первому механизму действия, который обеспечивает более благоприятный неврологический исход после развития ишемии, можно отнести ускорение нейрогенеза в субвентрикулярной зоне и миграцию клеток-предшественников в участок поражения, а также ускорение нейрогенеза в перинфарктной зоне. Вторым компонентом регенераторного действия цитиколина является сдвиг в сторону процессов торможения в коре головного мозга около участка поражения.

В данном исследовании лечение цитиколином привело к значительному ускорению функционального восстановления на примере теста по удалению клейкой ленты и теста с цилиндром, которые отлично показывают даже незначительный дефицит функции при тромботическом инсульте. Фармакологическая стимуляция цитиколином снизила постишемический функциональный дефицит, хотя терапию начали через сутки после возникновения ишемии, т. е. вне периода, необходимого для развития нейропротекторного эффекта, но в пределах широкого терапевтического окна цитиколина, которое и является предметом данного исследования. Важно отметить, что указанные положительные эффекты цитиколина не были связаны с разницей в объеме поражения коры головного мозга, неповрежденных тканей головного мозга и с формированием астроглиальных рубцов вблизи зоны инфаркта. В исследуемой группе отмечалось снижение активности микроглии лишь вокруг участка поражения. Поскольку микроглия, по-видимому, играет важную роль в ускорении восстановления при остром ишемическом инсульте, такие данные могут говорить о наличии других, более мощных механизмов действия цитиколина (J. Kriz et al., 2009).

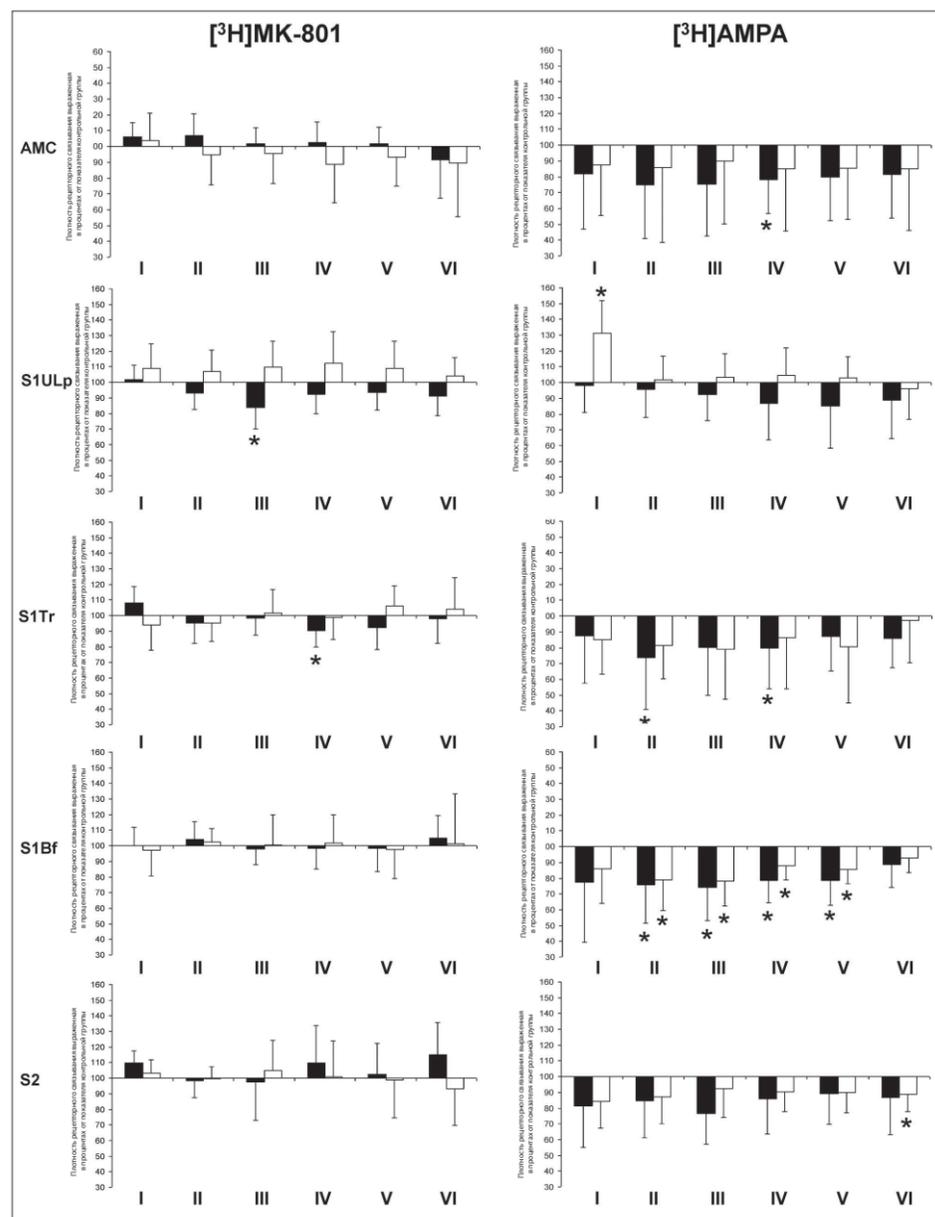


Рис. 5. Связывание рецепторов [³H]МК-801 и [³H]АМРА в прилегающей моторной коре, удаленном верхнем крае первичной соматосенсорной коры, области иннервации туловища в соматосенсорной коре, колончатых полях и вторичной соматосенсорной коре. Связывание рецепторов [³H]МК-801 практически не изменено в исследуемой группе. Связывание рецепторов [³H]АМРА значительно снижено на стороне поражения и контралатерально во II и в V слое колончатых полей (значения представлены в процентах от показателей контрольной группы)

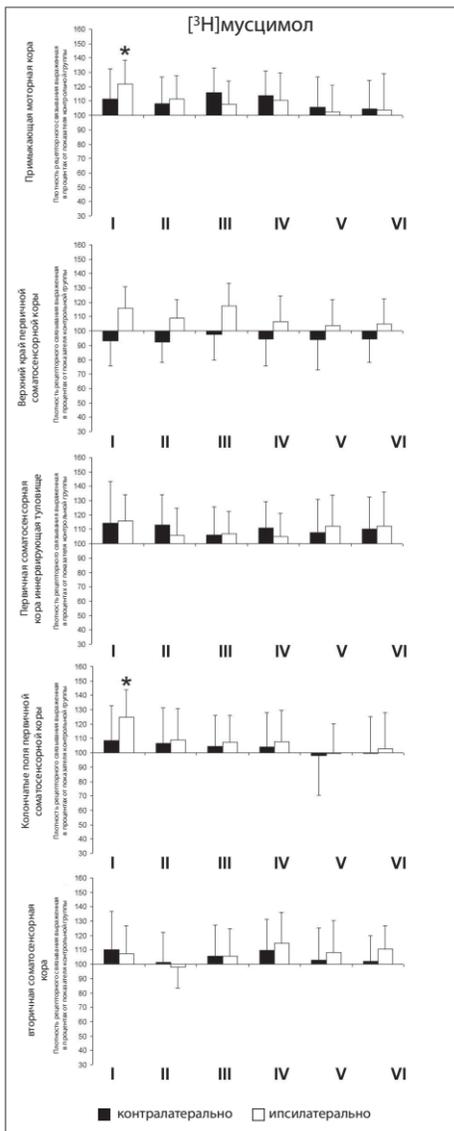


Рис. 6. Связывание рецепторов $[^3\text{H}]$ мусцимола в прилегающей моторной коре, верхнем крае первичной соматосенсорной коры, области иннервации туловища в соматосенсорной коре, колончатых полях и вторичной соматосенсорной коре. Статистически значимые различия между исследуемой и контрольной группой зафиксированы только в моторной коре и колончатых полях

По всей вероятности, процессы нейрогенеза сыграли решающую роль в функциональном восстановлении после экспериментального инсульта. В норме новые нейроны поступают в зубчатую извилину гиппокампа из субгранулярной зоны, а в обонятельную луковицу – из субвентрикулярной зоны. Развитие инсульта приводит к изменениям в обычном процессе нейрогенеза: происходят пролиферация клеток в субвентрикулярной и субгранулярной зонах и миграция незрелых нейронов из субвентрикулярной зоны в пораженный участок мозга (R.L. Zhang et al., 2009). В недавнем исследовании было убедительно показано, что в поврежденные участки коры головного мозга на протяжении года после тромботического инсульта постоянно поступают новые клетки-предшественники из субвентрикулярной зоны (A.M. Osman et al., 2011). Однако в настоящем исследовании удалось впервые продемонстрировать, что цитиколин оказывает значительное влияние на постинсультный нейрогенез и миграцию нейронов в пораженный участок. Терапия цитиколином также приводит к росту числа BrdU/NeuN-позитивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа, субвентрикулярной и перинфарктной зонах. Удалось подтвердить и миграцию даблкортин-позитивных клеток-предшественников из субвентрикулярной зоны в пораженный участок мозга через 28 дней после тромботического инсульта.

На первый взгляд, нейрорегенераторные способности новых нейронов должны быть ограничены в связи с тем, что большинство этих клеток подвержены апоптозу еще на ранней стадии своего развития (J.J. Ohab et al., 2006). Однако использование трофических факторов (мозговой нейротрофический фактор и колониестимулирующий фактор гранулоцитов) повышает выживаемость незрелых нейронов, что приводит

к увеличению нейрорегенераторных возможностей процесса нейрогенеза (A. Schneider et al., 2005). Кроме того, имеются убедительные доказательства взаимосвязи процесса нейрогенеза и улучшения восстановления после инсульта. Ослабление сенсомоторного дефицита в условиях активизации процессов нейрогенеза под действием цитиколина является убедительным аргументом для использования этого препарата. Такие результаты исследования расширяют имеющиеся данные о том, что цитиколин ускоряет восстановление после инсульта за счет влияния на уже существующие нейронные структуры (усложняет строение дендритных сплетений и повышает плотность шипиков пирамидных нейронов в V слое контралатеральной сенсомоторной коры).

Поскольку цитиколин обладает мембраномодулирующими свойствами, он может влиять на многие виды мембраносвязанных рецепторов. В данном исследовании изучены изменения в плотности рецепторов возбуждающих и тормозящих нейромедиаторов под влиянием цитиколина. Существует немало доказательств того, что нейротрофические свойства цитиколина при остром инсульте практически совпадают с его антиглутаматергическим действием. Даже в исследованиях *in vitro* цитиколин препятствовал глутаматопосредованному апоптозу двигательных нейронов и гранулярных клеток мозжечка. Более того, совместное назначение МК-801, антагониста рецепторов NMDA, с цитиколином приводило к взаимоусиливающему нейротрофическому действию этих препаратов через 7 дней после окклюзии средней мозговой артерии. Тем не менее в последние годы выяснилось, что длительность эксайтотоксической постишемической фазы, характеризующейся гиперактивацией рецепторов глутамата, является неожиданно ограниченной. В эксперименте на животных было убедительно продемонстрировано, что при черепно-мозговой травме гиперактивация рецепторов NMDA происходит только в первый час после эксайтотоксического действия, после чего наступает тяжелый и длительный функциональный дефицит. Стимуляция рецепторов NMDA через 24 и 48 ч после травмы значительно улучшала функциональный исход. Транзиторная очаговая ишемия головного мозга также снижала плотность связывания $[^3\text{H}]$ МК801, а терапия антагонистом NMDA снова улучшила неврологический исход заболелания. В настоящем исследовании выяснилось, что терапия цитиколином приводит к росту плотности связывания NMDA- и AMPA-рецепторами в перинфарктной зоне через 28 дней после тромботического инсульта, что улучшает неврологический исход (J. Dhawan et al., 2011). Такие показатели согласуются с гипотезой о том, что цитиколин является безопасным препаратом, который не препятствует течению обычных восстановительных процессов. В предыдущих исследованиях эффективности мозгового трофического фактора и колониестимулирующего фактора гранулоцитов в постинсультном восстановлении наилучшие результаты были связаны с повышением или поддержанием на одном уровне плотности связей глутаматных рецепторов в перинфарктной зоне. В дальнейшем эти данные могут подтвердить гипотезу о том, что функциональный исход после перенесенного инсульта может быть улучшен в долгосрочной перспективе при наличии гипервозбудимости во время постинсультной хронической фазы.

Diederich K. et al. Citicoline Enhances Neuroregenerative Processes After Experimental Stroke in Rats. Stroke. 2012; 43 (7): 1931-1940.

Перевел с англ. Игорь Кравченко



АНОНС

Міністерство охорони здоров'я України
Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика
Асоціація анестезіологів України
Клінічна лікарня «Феофанія» ДУС
University College London Centre for Anaesthesia
National Hospital for Neurology and Neurosurgery
The Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland

Науково-практична конференція

VI Британсько-український симпозиум

«Новітні тенденції в сучасній анестезіології та інтенсивній терапії – акцент на проблемах безпеки пацієнта та моніторингу»

24-25 квітня, м. Київ

Місце проведення: Клінічна лікарня «Феофанія» (вул. Заболотного, 21).

Програма заходу та детальна інформація з організаційних питань доступні на сайті конференції: www.anaesthesiaconference.kiev.ua

Оргкомітет

Адреса: 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9,
НМАПО ім. П.Л. Шупика,
кафедра анестезіології та інтенсивної терапії.

Тел.: +380 44 518-41-57

Контактна особа: доцент Максим Миколайович Пилипенко

E-mail: maxpyl@yahoo.com



www.anaesthesiaconference.kiev.ua

Новітні тенденції

в сучасній анестезіології та інтенсивній терапії – акцент на проблемах безпеки пацієнта та моніторингу



Шостий Британсько-Український Симпозиум

Клінічна лікарня «Феофанія»
Київ, вул. Академіка Заболотного, 21

Шановні колеги!
Ми з радістю запрошуємо вас на шостий Британсько-український симпозиум, присвячений питанням безпеки пацієнтів в анестезіології й інтенсивній терапії.

Лікарі-анестезіологи надають допомогу хірургічним пацієнтам, які прийшли на планову операцію і очікують комфорту та безпеки протягом усього періопераційного періоду. У таких випадках навіть незначне відхилення стану пацієнта від норми може сприйматися як ускладнення і призводити до конфліктів між лікарем та пацієнтом і між лікарями суміжних спеціальностей. В умовах інтенсивної терапії анестезіологи борються за життя пацієнтів, які перебувають у критичному стані і в яких перебіг захворювання часто ускладнюється розвитком все нових і нових симптомів та синдромів. Як у таких різних ситуаціях максимально забезпечити безпеку пацієнтів і мінімізувати кількість невиправданих претензій до лікарів-анестезіологів? Завдання складне, проте дуже важливе, тож потребує пошуку сучасних та оптимальних рішень.

Зараз в Україні в тісній співпраці з Радою Європи проходить активна робота з розробки Національного плану з безпеки пацієнтів, і планується, що в конгресі братимуть участь провідні лідери цього процесу. Ми хочемо, щоб лікарі-анестезіологи теж долучилися до цієї діяльності. Ми сподіваємося, що порівняння передового британського та європейського досвіду з напрацюваннями провідних українських експертів надасть учасникам симпозиуму знання та натхнення для покращення їх щоденної практики і більшої впевненості у своїх силах. До зустрічі на симпозиумі!

З повагою,
завідувач кафедри анестезіології та ІТ
Національної медичної академії
післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика,
доктор медичних наук, професор І.П. Шлапак

Дорогі колеги та друзі!
Маю абсолютне задоволення анонсувати VI Британсько-український симпозиум, присвячений безпеці пацієнтів. Усіх нас об'єднує той факт, що така спеціальність, як анестезіологія, завжди була на передовому рубежі в ситуаціях, пов'язаних з менеджментом клінічних ризиків. Безпека пацієнтів є визначальною в усіх аспектах нашої щоденної практики, нашого навчання та безперервної професійної освіти.

Зовсім недавно, 2010 року, європейські та британські анестезіологи досягли ще однієї важливої віхи розвитку професійного становлення, опублікувавши Гельсінську декларацію про безпеку пацієнтів в анестезіології. Цього року ми розширили наш лекторський склад, запросивши міжнародних доповідачів з інших країн як на континенті, так і за його межами з метою забезпечити найбільш повну і збалансовану програму конференції.

Сподіваюся побачити вас у квітні!
З найкращими побажаннями і повагою,
Roman Cregg

Шановні друзі!
Уже стало доброю традицією для Клінічної лікарні «Феофанія» приймати на своїй базі Британсько-український симпозиум з анестезіології.

Для нас велика честь приймати участь у найбільш потужному за науковою і практичною цінністю анестезіологічному симпозиумі в країні. Враховуючи зростання кількості інвазивних процедур і впровадження інтенсивних, можливо, й агресивних методів лікування, тема цього симпозиуму є надзвичайно актуальною.

Ми завжди прагнули впроваджувати новітні методики діагностики, лікування і оздоровлення з їх проведенням інші лікувальні заклади України.
Ми щиро раді співпраці і запрошуємо до нашого лікувального закладу.
Головний лікар КЛ «Феофанія» І.П. Семенів