

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ КОРТЕКСИНА И ИШЕМИЧЕСКОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ

© И. В. Зарубина, Г. В. Бузник, П. Д. Шабанов

ФГКВООУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны России, Санкт-Петербург

**Резюме.** Хронические расстройства мозгового кровообращения при отсутствии эффективного лечения приобретают прогрессирующий характер. Часто при этом наблюдаются эпизоды транзиторных ишемических атак, которые рассматриваются, прежде всего, как фактор риска мозгового инсульта, хотя и обсуждается preconditionирующий эффект этой патологии при последующем ишемическом повреждении мозга. Известно, что ишемическое preconditionирование представляет собой острую адаптацию органа к ишемии и реперфузии и характеризуется общностью метаболических ответов на preconditionирующие стимулы. Перспективное направление терапии последствий ишемии мозга связано с применением нейроспецифических пептидов, которые проявляют широкий спектр фармакологических эффектов, безопасны и предпочтительны пациентами. В последние годы повышенный интерес привлекает к себе пептидный препарат кортексин, представляющий вытяжку из коры мозга животных (органопрепарат). Кортексин содержит комплекс низкомолекулярных пептидов (включающих левовращающие глутаминовую, аспарагиновую кислоты, глицин и другие аминокислоты), витаминов (токоферола, тиамина, рибофлавина, ретинола) и микроэлементов (цинка, марганца, селена, меди, магния). Существенной проблемой лечения расстройств мозга после ишемии являются различия между людьми в индивидуальной стрессоустойчивости. Важное значение резистентности к недостатку кислорода в патогенезе ишемии головного мозга послужило основанием для исследования в настоящей работе эффективности нейропротекторного действия кортексина при хроническом ишемическом повреждении головного мозга, протекающего на фоне раннего и позднего ишемического preconditionирования у животных с различной индивидуальной устойчивостью к гипоксии. Целью исследования была оценка нейропротекторных эффектов кортексина и ишемического preconditionирования у крыс с перевязкой общих сонных артерий.

**Ключевые слова:** ишемическое preconditionирование; головной мозг; кортексин; индивидуальная устойчивость к гипоксии.

## NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF CORTEXIN AND ISCHEMIC PRECONDITIONING

© I. V. Zarubina, G. V. Buznik, P. D. Shabanov

Russian Medicomilitary Academy, Saint Petersburg, Russia

**Abstract.** *The purpose* was to assess neuroprotective effects of cortexin and ischemic preconditioning in rats with occlusion of both carotid arteries. *Methods.* The Wistar rats were divided into two groups according to their resistance to hypoxia. All rats were raised in barocamera on altitude 11 000 m with speed 50 m/sec and exposition up to agonal breath. Rats resistant to hypoxia more than 10 min were qualified as high resistant (HR), less than 5 min as low resistant (LR) to hypoxia. Ischemic preconditioning was reproduced by the 3-times temporary occlusions of common carotid arteries (5 min each) with 15-min reperfusion interval between occlusions. The chronic ischemia was modeled by means of ligation (permanent occlusion) of both carotid arteries in 1 h (early preconditioning) or 24 h (delayed preconditioning) after preconditioning procedure. Cortexin 1 mg/kg was administered intraperitoneally 7 days after occlusion of carotid arteries. Neurological status was assessed using McGrow's stroke-index. *Results.* In postischemic period, the functional and metabolic changes in the brain of HR and LR rats were more significant in conditions of delayed preconditioning. In group of early preconditioning, a number of survival rats on 7th day was more than in delayed preconditioning group. Cortexin administration (1 mg/kg, 7 days) increased quantity of survival rats, especially in delayed preconditioning group. The maximal effect of cortexin was observed in delayed preconditioning group. Also cortexin decreased malonic dialdehyde level and increased superoxide dismutase activity of the brain tissue in all groups of rats. *Conclusion.* The course administration of polypeptide drug cortexin reduces neurological deficit signs, recovers structure of individual behavior of rats with different resistance to hypoxia and performs antioxidant action in chronic ischemic damage of the brain on the background of early and delayed preconditioning.

**Key words:** ischemic preconditioning; brain; cortexin; individual resistance to hypoxia.

Хронические расстройства мозгового кровообращения при отсутствии эффективного лечения приобретают прогрессирующий характер. Часто при этом наблюдаются эпизоды транзиторных ишемических атак, которые рассматриваются, прежде всего, как фактор риска мозгового инсульта.

та, хотя и обсуждается прекодиционирующий эффект этой патологии при последующем ишемическом повреждении мозга [11]. Известно, что ишемическое прекодиционирование представляет собой острую адаптацию органа к ишемии и реперфузии и характеризуется общностью метаболических ответов на прекодиционные стимулы. Перспективное направление терапии последствий ишемии мозга связано с применением нейроспецифических пептидов, которые проявляют широкий спектр фармакологических эффектов, безопасны и предпочтительны пациентами [2, 9]. В последние годы повышенный интерес привлекает к себе пептидный препарат кортексин, представляющий вытяжку из коры мозга животных (органопрепарат). Кортексин содержит комплекс низкомолекулярных пептидов (включающих левовращающие глутаминовую, аспарагиновую кислоты, глицин и другие аминокислоты), витаминов (токоферола, тиамина, рибофлавина, ретинола) и микроэлементов (цинка, марганца, селена, меди, магния). Молекулярный вес нейропептидов кортексина не превышает 10 000 дальтон; доказано [6, 10, 13], что они проникают через гематоэнцефалический барьер, проявляя тот же спектр фармакологической активности, как и при введении в мозг. Существует мнение [2, 9], что короткие пептиды (от 2 до 10 аминокислотных остатков) обладают более высокой биологической активностью по сравнению с их высокомолекулярными предшественниками из-за более длительного сохранения в организме без структурных изменений (последствий воздействия пептидаз).

Существенной проблемой лечения расстройств мозга после ишемии являются различия между людьми в индивидуальной стрессоустойчивости. Важное значение резистентности к недостатку кислорода в патогенезе ишемии головного мозга послужило основанием для исследования в настоящей работе эффективности нейропротекторного действия кортексина при хроническом ишемическом повреждении головного мозга, протекающего на фоне раннего и позднего ишемического прекодиционирования у животных с различной индивидуальной устойчивостью к гипоксии.

Целью исследования была оценка нейропротекторных эффектов кортексина и ишемического прекодиционирования у крыс с перевязкой общих сонных артерий.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 88 белых беспородных крысах-самцах массой 160–180 г, полученных из питомника РАМН «Рапполово» (Ленинградская

область). Исследования осуществлялись в соответствии с «Руководящими методическими материалами по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств», «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267) [1].

Крыс разделяли по устойчивости к гипоксии, «поднимая» их в барокамере на высоту 11000 м со скоростью 50 м/с и экспозицией на высоте до возникновения агонального дыхания. Животные, выдерживающие воздействие гипоксии в течение 10 мин считались высокоустойчивыми (ВУ), 5 мин — низкоустойчивыми (НУ) к гипоксии. Ишемическое прекодиционирование создавали 3-кратной окклюзией общих сонных артерий (по 5 мин) сосудистыми зажимами с интервалом реперфузии 15 минут. В 1-й серии опытов хроническую ишемию мозга моделировали перевязкой сонных артерий через 1 ч после прекодиционирования (называли это ранним прекодиционированием), во 2-й серии опытов перевязку сонных артерий осуществляли через 24 ч (позднее прекодиционирование).

Растворенную в физиологическом растворе субстанцию кортексина (ЗАО «Герофарм», Санкт-Петербург) вводили крысам внутривентриально в дозе 1 мг/кг сразу после окклюзии сонных артерий и далее один раз в сутки в течение 7 дней. Оценку неврологического статуса, поведенческих реакций и биохимические исследования проводили во всех группах животных через 7 суток после перевязки обеих сонных артерий, введения 0,9%-го раствора NaCl (контроль) или кортексина.

Неврологический статус животных после окклюзии общих сонных артерий исследовали с помощью шкалы stroke-index McGrow по сумме соответствующих баллов. Для регистрации мышечного тонуса использовали тест подтягивания животных на горизонтальной перекладине, натянутой на высоте 30 см от поверхности стола [1, 4].

Целостность физиологической реакции крыс на ишемию оценивали в тесте «открытого поля» и «приподнятого крестообразного лабиринта» с учетом ориентировочно-исследовательской, эмоциональной и двигательной активности, уровня тревожности по поведенческому атласу для грызунов [7]. Оценку когнитивных функций (обучения и сохранения навыка) проводили по условной реакции пассивного избегания. Спустя сутки после этого теста оценивали уровень депрессии животных в тесте Порсолта или «поведенческого отчаяния» по плавательной пробе [12].

Таблица 1

Влияние кортексина на выживаемость животных (%) после ишемии головного мозга,  $M \pm m$ ,  $n = 10$ 

Группы животных	Раннее прекондиционирование		Позднее прекондиционирование	
	ВУ	НУ	ВУ	НУ
Контроль	100±5	100±5	100±5	100±5
Ишемия	50±12*	35±11*	50±12*	30±10*
Ишемия + кортексин	60±11*	55±11*	75±10*#	70±10*#

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем; # —  $p < 0,05$  в сравнении с группой ишемии

Об интенсивности свободнорадикальных процессов в мозге судили по содержанию малонового диальдегида активности супероксиддисмутазы [8].

Статистическую обработку проводили, используя t-критерий Стьюдента при уровне значимости различий 95% ( $p < 0,05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что функционально-метаболические изменения в головном мозге различных по устойчивости к гипоксии животных в постишемическом периоде были более значимы в случае «позднего прекондиционирования». При этом у НУ крыс нарушения неврологического статуса и поведенческих реакций, а также изменения антиоксидантных систем были более выражены, чем у ВУ к гипоксии крыс. В серии с ранним прекондиционированием на 7 сутки после ишемии выживало больше животных, чем в серии с поздним прекондиционированием (табл. 1). Введение кортексина увеличивало выживаемость животных, но наиболее значимый эффект наблюдался в случае позднего прекондиционирования.

После окклюзии общих сонных артерий на протяжении семи суток выявляли животных с легкой и тяжелой неврологической симптоматикой. Неврологические нарушения были более выражены в группе НУ крыс. У животных, получавших кортексин, в постишемическом периоде отсутствовали параличи конечностей, увеличивалась скорость движений, уменьшалась слабость конечностей и количество маневрных движений. Во второй серии (позднее прекондиционирование) выраженность неврологических нарушений была более выраженной, но применение кортексина уменьшало их проявления. На фоне кортексина снижалось количество животных, не подтянувшихся на горизонтальной перекладине, что свидетельствует о возрастании у них мышечного тонуса. У животных увеличивалась локомоторная активность, возрастала ориентировочно-исследовательская активность, восстанавливалась эмоциональная компонента поведения. Снижался уровень тревожности, что свидетельствует о наличии у кортексина анксиолитических свойств (рис. 1). Препарат проявлял также антидепрессантное действие, увеличивая время ак-

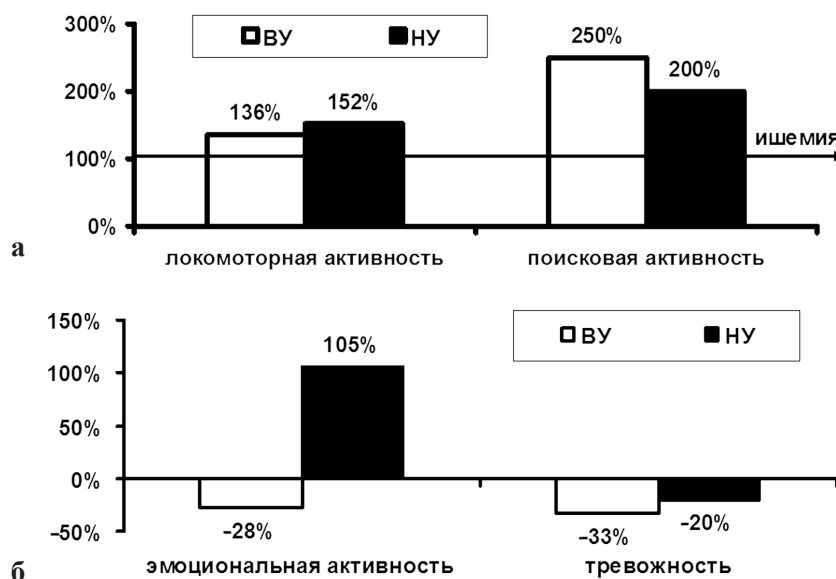


Рис. 1. Влияние кортексина на поведенческие реакции крыс при ишемии головного мозга на фоне раннего (А) и позднего прекондиционирования (Б) относительно контроля, принятого за 100% (график А) и 0% (график Б)

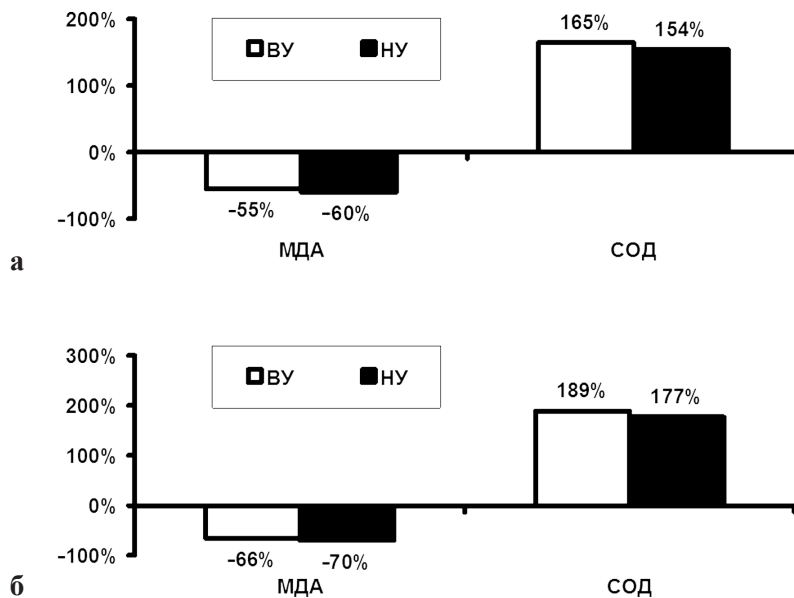


Рис. 2. Влияние кортексина на содержание малонового диальдегида и активность супероксиддисмутазы в головном мозге крыс при ишемии головного мозга на фоне раннего (А) и позднего прекондиционирования (Б) относительно контроля, принятого за 0 %

тивного плавания с уменьшением пассивного плавания и времени неподвижности животных в тесте Порсолта. Введение кортексина облегчало выработку условной реакции пассивного избегания по сравнению с нелечеными животными, повышало утраченную вследствие ишемии мозга обучаемость и сохраняло памятный след.

Применение в постишемическом периоде кортексина снижало уровень малонового диальдегида и увеличивало активность супероксиддисмутазы (рис. 2), что указывает на биохимические признаки улучшения восстановительных процессов в головном мозге.

Следовательно, при хронической ишемии головного мозга введение кортексина на фоне ишемического прекондиционирования предупреждает дезинтеграцию отдельных компонентов целостной поведенческой реакции и способствует восстановлению структуры индивидуального поведения НУ и ВУ к гипоксии особей, нормализует процессы оксидации/антиоксидации. Интересно отметить, что наибольшую эффективность кортексин проявляет при позднем прекондиционировании.

Приступая к обсуждению результатов исследования, важно подчеркнуть, что в целом получены ожидаемые результаты, подтверждающие нейропротекторные свойства кортексина. Они были неоднократно выявлены в разных моделях экспериментов (пренатальный и постнатальный стресс, ишемия, травма головного мозга, интоксикационные воздействия) [3, 4]. Однако в подобных исследованиях всегда мало касаются степени положительных

изменений при назначении кортексина. В наших опытах при оценке ишемии был использован самый жесткий показатель — выживаемость животных после двусторонней перевязки сонных артерий. Из таблицы 1 видно, что процент погибших крыс при прекондиционировании и последующей перевязке обеих сонных артерий сравнительно высок и составляет в разных группах минимум 50%, а максимум — 70%. Само по себе это уже высокие показатели, поскольку обычно при перевязке обеих сонных артерий в течение двух недель выживает до 90% животных. То есть сама манипуляция с созданием прекондиционирования утяжеляет состояние животных и повышает процент их гибели. На этом фоне кортексин работает как нейропротектор, повышая процент выживаемости животных до 70–75%, то есть в 1,5–2 раза. Сам по себе этот факт следует считать выдающимся. Далее возникает закономерный вопрос, почему все же защитные эффекты «позднего прекондиционирования» более значимы в сравнении с эффектами «раннего прекондиционирования»? Например, можно связать эти данные с увеличенным образованием свободных радикалов кислорода и NO во время длительного ишемического стресса [9]. Но в наших опытах биохимические изменения оксидативного статуса в группах с «ранним прекондиционированием» и поздним прекондиционированием почти идентичны. Тогда в чем же дело? Если сравнить ВУ и НУ животных, то эффекты кортексина более выражены в группе НУ к гипоксии крыс. Так, выживаемость в группе НУ крыс с «поздним прекондиционированием» возрастает

более чем в 2 раза (с  $30 \pm 10$  до  $70 \pm 10\%$ ). Подобная тенденция наблюдается и в группе НУ животных с «ранним прекондиционированием» (выживаемость выросла с  $35 \pm 11$  до  $55 \pm 11\%$ ). Стало быть, дело не только и не столько в прекондиционировании, сколько в индивидуальной чувствительности к гипоксии. Вероятно, животные НУ группы более значимо реагируют на лечение кортексином в сравнении с ВУ к гипоксии крысами. Действительно, это подтверждается и недавно полученными нами данными с моделированием травматического токсикоза у крыс и лечения его нейропротекторными препаратами в зависимости от индивидуальной чувствительности к стрессу и гипоксии [5]. Именно индивидуальная чувствительность к стрессогенным факторам (гипоксии, боли, иммобилизационному стрессу) в значительной степени и определяет эффекты нейропротекторных средств, в том числе и пептидной природы.

Таким образом, применение кортексина уместно для повышения эффективности нейропротективной терапии хронического ишемического повреждения головного мозга, протекающего на фоне транзиторных ишемических атак. При ишемической энцефалопатии кортексин наиболее эффективен в более поздние сроки после кратковременных ишемических эпизодов (после позднего прекондиционирования).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.; 2000.
2. Дьяконова М.М., Каменский А.А. Пептидная нейропротекция. СПб.: Наука; 2009.
3. Зарубина И.В., Павлова Т.В. Нейропептиды как корректоры функционально-метаболических нарушений ишемии головного мозга. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2007; 5 (2): 20–33.
4. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Ишемия головного мозга, прекондиционирование и нейропротекция. Цереброваскулярная патология — новые возможности низкодозированной нейропротекции. СПб.: Наука; 2014.
5. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Травматический токсикоз и антиоксидантные средства. Фармакология экстремальных состояний. СПб.: Информ-навигатор; 2014.
6. Лебедев А.А., Ганапольский В.П., Павленко В.П., Стеценко В.П., Лавров Н.В., Воейков И.М., Марков С.В., Шабанов П.Д. Сопоставление центральных эффектов кортексина и церебролизина при их введении в желудочки мозга и системно (внутрибрюшинно). Психофармакология и биологическая наркология. 2006; 6 (3): 275–1283.
7. Михеев В.В., Шабанов П.Д. Фармакологическая асимметрия мозга. СПб.: Элби-СПб; 2007.
8. Путилина Ф.Е., Галкина О.В., Ещенко Н.Д., Диде Г.П. Практикум по свободнорадикальному окислению. СПб.: Изд-во СПбГУ; 2006.
9. Шабанов П.Д. Доказательность нейропротекторных эффектов полипептидных препаратов: нерешенные вопросы. Нервные болезни. 2011; 1 (4): 17–20.
10. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Стеценко В.П., Лавров Н.В., Марков С.В., Воейков И.М. Сравнительное изучение эффектов кортексина и церебролизина при их введении в желудочки мозга. Нейронауки. 2007; 2 (10): 9–14.
11. Gross G.J., Fryer R.M. Mitochondrial KATP channels: triggers or distal effectors of ischemic or pharmacologic preconditioning? Circ. Res. 2000; 87: 431–433.
12. Porsolt R.D., Lenegre A., Experimental Approaches to Anxiety and Depression/Ed. by J.M. Elliot, D.J. Heal, C.A. Marsden. New York–London: John Willey and Sons; 1992.
13. Shabanov P.D., Lebedev A.A., Stetsenko V.P., Lavrov N.V., Markov S.V., Vojekov I.M. Comparison of behavioral effects of cortexin and cerebrolysin injected into cerebral ventriculi. Bull. Exp. Biol. Med. 2007; 143: 437–441.

#### REFERENCES

1. Voronina T.A., Seredenin S.B. Rukovodstvo po ehksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. M.; 2000. (in Russian).
2. Dyakonova M.M., Kamenskii A.A. Peptidnaya nejroprotekciya [Peptide neuroprotection]. SPb.: Nauka; 2009. (in Russian).
3. Zarubina I.V., Pavlova T.V. Neuropeptidy kak korrektoory funktsionalno-metabolicheskikh narushenij ishemii golovnogogo mozga [Neuropeptides as a corrector of functional and metabolic disorders in cerebral ischemia]. Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii. 2007; 5 (2): 20–33. (in Russian).
4. Zarubina I.V., Shabanov P.D. Ishemiya golovnogogo mozga, prekoncionirovanie i nejroprotekciya. Cerebrovaskulyarnaya patologiya — novye vozmozhnosti nizkodozirovannoj nejroprotekcii [Cerebral ischemia, preconditioning and neuroprotection. Cerebrovascular pathology — new opportunities for low-dose neuroprotection]. SPb.: Nauka; 2014. (in Russian).
5. Zarubina I.V., Shabanov P.D. Travmaticheskij toksikoz i antitoksicheskie sredstva. Farmakologiya ehkstre-malnih sostoyanij [Traumatic toxemia and antitoxic

- agents. Pharmacology of extreme conditions]. SPb.: Inform-navigator; 2014. (in Russian).
6. Lebedev A.A., Ganapol'skii V.P., Pavlenko V.P., Stetsenko V.P., Lavrov N.V., Voeikov I.M., Markov S.V., Shabanov P.D. Sopostavlenie centralnykh ehffektov korteksina i cerebrolizina pri ih vvedenii v zheludochki mozga i sistemno (vnutribryushinno) [Comparison of central effects of cortexin, cerebrolysin and after administration into the ventricles of the brain and systemic (intraperitoneally)]. Psihofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya. 2006; 6 (3): 275–1283. (in Russian).
  7. Mikheev V.V., Shabanov P.D. Farmakologicheskaya assimetriya mozga [Pharmacological asymmetry of brain]. SPb.: Elbi- SPb; 2007. (in Russian).
  8. Putilina F.E., Galkina O.V., Eshchenko N.D., Dije G.P. Praktikum po svobodnoradikalnomu okisleniyu [Workshop on free radical oxidation]. SPb.: Ild-vo SPbGU; 2006. (in Russian).
  9. Shabanov P.D. Dokazatelnost nejroprotektornykh ehffektov polipeptidnykh preparatov: nereshennyye voprosy [Evidence of neuroprotective effects of polypeptide drugs: unresolved issues]. Nervnye bolezni. 2011; 1 (4): 17–20. (in Russian).
  10. Shabanov P.D., Lebedev A.A., Stetsenko V.P., Lavrov N.V., Markov S.V., Voeikov I.M. Sravnitel'noe izuchenie ehffektov korteksina i cerebrolizina pri ih vvedenii v zheludochki mozga [Comparative study of effects of cerebrolysin and cortexin after administration into the ventricles of the brain]. Neironauki. 2007; 2 (10): 9–14. (in Russian).
  11. Gross G.J., Fryer R.M. Mitochondrial KATP channels: triggers or distal effectors of ischemic or pharmacologic preconditioning? Circ. Res. 2000; 87: 431–433.
  12. Porsolt R.D., Lenegre A., Experimental Approaches to Anxiety and Depression/Ed. by J.M. Elliot, D.J. Heal, C.A. Marsden. New York–London: John Willey and Sons, 1992.
  13. Shabanov P.D., Lebedev A.A., Stetsenko V.P., Lavrov N.V., Markov S.V., Voeikov I.M. Comparison of behavioral effects of cortexin and cerebrolysin injected into cerebral ventriculi. Bull. Exp. Biol. Med. 2007; 143: 437–441.

## ◆ Информация об авторах

*Зарубина Ирина Викторовна* – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник. Кафедра фармакологии. ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Zarubina Irina Viktorovna* – PhD, Leading Scientist. Department of Pharmacology. Russian Medicomilitary Academy. 6, Akademika Lebedeva St., St. Petersburg, 194044, Russia. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Бузник Галина Викторовна* – канд. биол. наук, доцент. Кафедра фармакологии. ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Buznik Galina Viktorovna* – MD, PhD, Associate Professor. Department of Pharmacology. Russian Medicomilitary Academy. 6, Akademika Lebedeva St., St. Petersburg, 194044, Russia. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Шабанов Пётр Дмитриевич* – д-р биол. наук, профессор, заведующий. Кафедра фармакологии. ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

*Shabanov Petr Dmitrievich* – MD, PhD, Dr Med Sci. Professor, Head. Department of Pharmacology. Russian Medicomilitary Academy. 6, Akademika Lebedeva St., St. Petersburg, 194044, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.