

N. V. Litvinenko, I. I. Delva, M. Yu. Delva  
 "Ukrainian medical Stomatological Academy" (Poltava)

### Influence of «Vazonat» preparation on cognitive disorders in chronic impairments of cerebral circulation

Cognitive disorders in chronic cerebral circulatory disorders are an important factor aggravating the course and worsen the prognosis of the disease and causes health and social exclusion of patients. Metabolic correction of the violations are deeply studied now. Conducted clinical and neuropsychological evaluation of 30 patients (19 women and 11 men) aged from 51 to 79 years with moderate cognitive impairment in discirculatory encephalopathy stage II, who on the background of vascular and antiplatelet therapy use Vazonat, 500 mg, (2 capsules in a single dose) within 20 days. The control group consisted of 20 patients (10 men and 10 women) aged 50 to 82 years with mild cognitive impairment in discirculatory encephalopathy stage II, treated with vascular and antiplatelet therapy without the use of drugs with metabolic properties. Analysis of the results revealed the ability of the drug "Vazonat" a multi-effect on cognitive function of different modalities, which indicates the universal nature of his actions, both in vascular and in neurodegenerative processes. The drug was well tolerated and can be regarded as an effective tool in the treatment of moderate cognitive disorders of different etiologies and prevention of dementia.

*Keywords:* moderate cognitive disorder, dementia, discirculatory encephalopathy, "Vazonat", treatment.

УДК 615.21:616:831-005.4

Э. В. Супрун, канд. мед. наук, доцент каф. клинической фармакологии  
 Национальный фармацевтический университет (г. Харьков)

### КОРРЕКЦИЯ РОНКОЛЕЙКИНОМ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ И КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ В УСЛОВИЯХ БИЛАТЕРАЛЬНОЙ ОККЛЮЗИИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ У КРЫС

На модели необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий изучен психофизиологический статус у крыс на фоне коррекции рекомбинантным интерлейкином-2 — Ронколейкином (0,01 мг/кг) в сравнении с пирацетамом (200 мг/кг) и тиотриазолином (50 мг/кг). Отмечено снижение выраженности постинсультных неврологических и когнитивных нарушений — улучшение показателей двигательной активности, психоневрологического статуса по шкале McGraw и воспроизведения рефлекса пассивного избегания, наиболее эффективным был Ронколейкин.

*Ключевые слова:* ИЛ-2, Ронколейкин, экспериментальная церебральная ишемия

Последние годы среди населения промышленно развитых стран продолжается постоянный рост числа пациентов с ишемическими инсультами (ИШИ), из которых погибает каждый третий, выжившие остаются длительно нетрудоспособными и нуждаются в длительном и дорогостоящем лечении с последующей реабилитацией. Однако даже при своевременном оказании всех необходимых лечебно-профилактических мероприятий большая часть пациентов с ИШИ остается в дальнейшем инвалидами [5].

Известно, что в первые часы после ишемического инсульта степень выраженности структурно-функциональных изменений нейронов в пострадавшей области мозга уменьшается от центра некроза к периферическим зонам пенумбры. Распространение нейродегенеративных изменений внутри области пенумбры имеет ряд особенностей, которые до 3—5 суток с момента заболевания определяют формирование окончательных размеров инфаркта мозга и последующих нейрональных потерь. Следовательно, актуальным остается поиск новых средств фармакологической защиты мозга для эффективной коррекции постишемических неврологических нарушений [3, 4].

После первичного поражения отдельных сверхчувствительных к ишемии нейронов, при нетяжелой или кратковременной фокальной ишемии развивается вторичное повреждение как результат агрессивного

воздействия на нейроны периинфарктной зоны клеток микроглии [2].

Микроглия, возбужденная ишемией, индуцирует реакции локального воспаления в области ишемического очага, которые занимают важное место среди механизмов вторичного поражения ткани мозга [6]. При ИШИ отмечается значительное повышение уровней провоспалительных факторов, что создает условия для острой гибели клеток первичного очага и отсроченной — перифокальной зоны, а также определяет динамику дальнейшего прогрессирования постишемических изменений [7, 14].

К провоспалительным факторам относятся цитокины — интерлейкины (IL-1, IL-6, IL-8) и фактор некроза опухоли (FNO $\alpha$ ). Первым из провоспалительных цитокинов в зоне ишемии продуцируется IL-1, который также обладает свойством стимулировать синтез секретлируемых Т-хелперами ростовых факторов — IL-2 и IL-4 и усиливает экспрессию рецепторов к ним, что создает условия для аутокринной регуляции пролиферации Т-хелперов [9, 15].

IL-2 является одним из основных участников формирования быстрого иммунного ответа организма — индуцирует пролиферацию В-лимфоцитов, активирует цитотоксические Т-лимфоциты, стимулирует естественные киллеры, генерирует лимфокин-активированные киллеры (LAK). Также IL-2 принимает участие в развертывании при ИШИ «цитокинового каскада», так как стимулирует синтез и секрецию ряда других цитокинов — IL-4, IL-6, гамма-интерферона, колоний-стимулирующих факторов (CSFs), факторов роста опухолей (THFs). В клинической практике рекомбинантный IL-2 (Ронколейкин) используется для коррекции вторичной иммунной недостаточности — в комплексной терапии сепсиса разной этиологии и других гнойно-воспалительных заболеваний, тяжелых бактериальных инфекций и онкологических процессов [8].

Принимая во внимание тот факт, что формирование нейродегенеративных изменений в постишемической зоне связано с формированием при ИШИ «цитокинового каскада», задачей настоящей работы явилось изучение влияния рекомбинантного IL-2 (Ронколейкина)

на динаміку показателів неврологічних і когнітивних порушень у крыс з експериментальним ішемічним інсультом.

Ісследования проводили на белых нелинейных крысах массой 170—200 г. Крысы получены из питомника ИФТ НАМН Украины. Животных содержали на стандартном рационе вивария при естественной смене дня и ночи. Все процедуры и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с «Положением об использовании лабораторных животных в биомедицинских исследованиях». Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) вызывали необратимой двусторонней окклюзией общих сонных артерий — под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг) посредством хирургического доступа выделяли общие сонные артерии, подвояли под них шелковые лигатуры и перевязывали.

Были проведены 2 серии опытов. В первой серии животные были разделены на 4 группы по 10 крыс: 1-я группа — ложнооперированные животные (ЛО), 2-я — животные с ОНМК (контрольная патология — группа КП), 3-я — животные с патологией, которым вводили Ронколейкин (группа Р) в дозе 0,01 мг/кг и 4-я группа — животные с патологией, которым вводили препарат сравнения пираретам (группа П) в дозе 500 мг/кг. Препараты вводили внутримышечно в профилактическом режиме — два раза в сутки на протяжении 3 дней, последний раз за 1 час до операции. Оценивали выживаемость крыс в течение 7 дней и выраженность отечных явлений в мозге крыс по его массе.

Во второй серии изучали животных 3 групп (аналогично 1—3 вышеуказанным группам), изменился только режим введения Ронколейкина — в дозе 0,01 мг/кг его вводили внутримышечно сразу после выхода животных из наркоза и в дальнейшем 1 раз в сутки в течение 18 дней. Оценивали динамику развития постинсультных нарушений, поведенческие эксперименты проводили в первой половине дня. Неврологический дефицит у животных оценивали по шкале Stroke-index McGraw (тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов) в течение острого периода ишемии и фазы восстановления — на 4 и 18 сутки. В эти же сроки изучали ориентировочно-исследовательское поведение крыс в условиях методики открытого поля — в течение 3 минут регистрировали горизонтальные и вертикальные перемещения, обследование отверстий. Обучение условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) проводили по стандартной методике после завершения наблюдения в восстановительном периоде нарушений мозгового кровообращения на 18 сутки.

Полученные результаты проанализированы с использованием критериев t-Стьюдента, U-параметра Манна — Уитни и критерия  $\chi^2$ . Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95 % ( $p < 0,05$ ).

В ходе первого эксперимента в течение 7 суток после операции в группе ЛО гибели животных не наблюдали. В группе контрольной патологии случаи гибели крыс отмечались до 5 суток включительно (рис. 1), показатель летальности увеличился с 60 % в первые сутки до 70 % на 5—7 сутки. В группе П гибель животных отмечалась до 3 суток включительно, показатель летальности также увеличился с 50 % в первые сутки до 60 % на 5—7 сутки. Гибель животных, получавших Ронколейкин, наблюдалась только в первые сутки, показатель выживаемости достоверно отличался от группы КП, начиная с 4 суток эксперимента ( $p^{КП} < 0,05$ ).

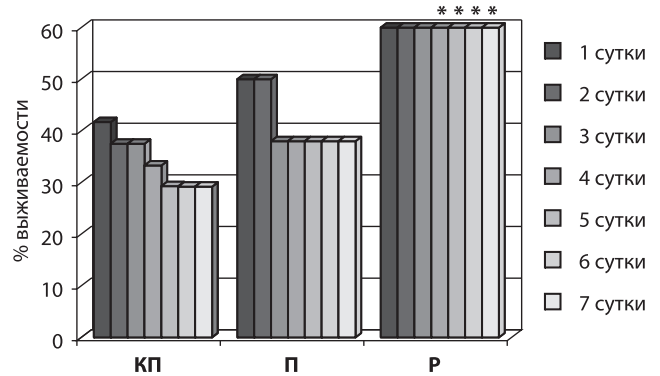


Рис. 1. Выживаемость крыс с церебральной ишемией

Примечания ко всем рисункам:

ЛО — группа ложнооперированных животных; П — группа пираретама; КП 4 и КП 18 — группа контрольной патологии на 4 и 18 сутки эксперимента; Р 4 и Р 18 — группа Ронколейкина на 4 и 18 сутки

Отклонения достоверны ( $p < 0,05$ ): \* — относительно ЛО; \*\* — относительно КП

При острой церебральной ишемии происходят последовательные процессы микроциркуляторно-клеточного каскада — снижение мозгового кровотока приводит к максимуму энергетического дефицита, развивается глутаматная «эксайтотоксичность», массивное внутриклеточное поступление ионов натрия и кальция, что стимулирует активацию фосфолипаз и протеиназ с образованием цитокинов. Внеклеточное высвобождение провоспалительных IL-1 и FNO $\alpha$  и медиаторов воспаления оказывает негативное воздействие на межклеточные структуры, окружающие клеточные мембраны и сосудистую стенку [4, 5].

Активированные цитокинами эндотелиальные клетки продуцируют адгезивные молекулы, которые дополнительно стимулируют образование медиаторов воспаления. При этом происходит повреждение базальной сосудистой мембраны, межэндотелиальных контактов и самой эндотелиальной выстилки церебральных сосудов. Эндотелий приобретает гемостатические прокоагуляционные свойства и претерпевает ряд существенных структурных повреждений (разрыв, сморщивание и коагуляционный некроз). Происходит увеличение проницаемости его базальной мембраны и трансэндотелиальных контактов для нейтрофилов и жидкости на фоне угнетения абсорбции. Это способствует формированию в течение 6—72 часов после развития ишемии цитотоксического отека глии и нейронов и проникновению токсических веществ из сосудистого русла в мозговую ткань на фоне продолжающихся оксидантных и прокоагуляционных реакций, что приводит к гибели жизненно важных нейронов с формированием инфарктного очага [3, 13].

Выраженность цитотоксического отека в мозге экспериментальных крыс оценивали по показателю массового коэффициента мозга (МКМ). У животных группы КП показатель МКМ (рис. 2) увеличился на 19 %, что отражает выраженность отека и степень тяжести состояния при церебральной ишемии. Применение пираретама частично уменьшило проявления отека на фоне церебральной ишемии — МКМ снизился на 5 %. Более эффективно действовал Ронколейкин, на фоне применения которого масса мозга достоверно снизилась относительно контрольных животных ( $p^{КП} < 0,05$ ).

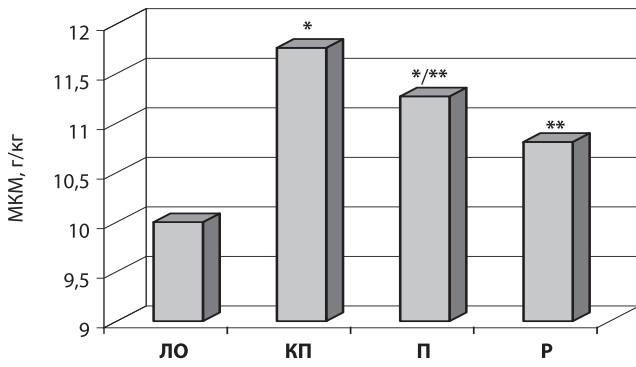


Рис. 2. Массовый коэффициент мозга (МКМ) у крыс с церебральной ишемией

Формирование цитотоксического отека на фоне повышенной продукции провоспалительных цитокинов сопровождается инфлюксом в зону ишемической инициации полиморфно-нуклеарных лейкоцитов, экспрессией лейкоцитарного адгезивного комплекса и эндотелиальных межклеточных молекул адгезии ICAM-1, избыточной продукцией свободных радикалов, что дополнительно ухудшает состояние нейронов в области ишемического повреждения. При этом на фоне перевозбужденных глутаматных NMDA-рецепторов активация  $Ca^{2+}$ -зависимой кальмодулинкиназы активирует нейрональную NOS и в течение нескольких секунд резко повышается синтез оксида азота. IL-1 экспрессирует в глиальных клетках индуцибельную NOS (iNOS), что ведет к гиперпродукции NO и токсическим эффектам его избыточных количеств. Высокие концентрации NO токсичны для клеток, ферментов, ионных каналов и генетического аппарата. Избыток NO нитрозилирует белки-ферменты дыхательной цепи митохондрий и цикла Кребса, ингибирует их, что ведет к истощению запасов НАД и АТФ, гибели нейронов по пути некроза или апоптоза и формированию отдаленных неврологических проблем [10, 12].

Исследование неврологического статуса крыс по отдельным показателям шкалы McGraw показало, что тяжелые неврологические нарушения в виде маневных движений, парезов и параличей у крыс группы ЛО не наблюдались. У большинства животных группы КП в остром периоде церебральной ишемии (рис. 3) наблюдались как умеренно выраженные неврологические нарушения (вялость, замедленность движений, слабость конечностей, птоз в 60 % случаев), так и тяжелые — маневные движения (80 %), парезы и параличи конечностей (90 %).

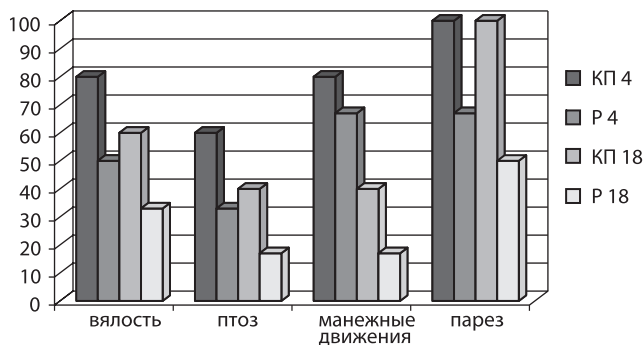


Рис. 3. Выраженность неврологического дефицита по некоторым показателям шкалы McGraw у крыс с церебральной ишемией

В восстановительном периоде после экспериментальной ишемии (рис. 4) у животных группы КП выраженность неврологических дефицитов изменилась незначительно. Применение Ронколейкина значительно уменьшило проявления указанных неврологических нарушений на протяжении всего эксперимента, существенно снизилась частота проявлений парезов и параличей конечностей, маневных движений, эффекты более выражены в периоде восстановления. Аналогичная динамика отмечена при анализе интегрального показателя неврологических дефицитов — суммы баллов по шкалы McGraw, который в группе Р в остром постишемическом и восстановительном периодах был значительно ниже и достоверно отличался от группы КП ( $p^{KP} < 0,01$ ).

Сумма баллов по шкале McGraw

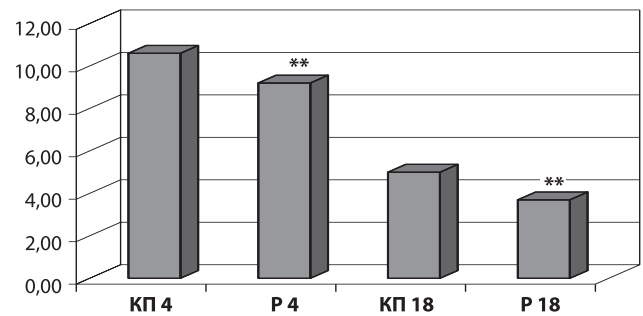


Рис. 4. Суммарный неврологический дефицит крыс с церебральной ишемией (шкала McGraw)

В эксперименте церебральная ишемия привела к выраженному снижению ориентировочно-исследовательской и двигательной активности животных. У крыс группы КП на 4 сутки эксперимента отмечено резкое равномерное уменьшение всех показателей — количества стоек, пересеченных квадратов и исследованных отверстий на 80—94 % от уровня группы ЛО ( $p^{ЛО} < 0,01$ ) (рис. 5). В последующем у контрольных животных отмечена незначительная динамика этих показателей — к 18 суткам эксперимента они достигли 40—43 % от уровня ложнооперированных животных ( $p^{ЛО} < 0,05$ ).

% от ЛО

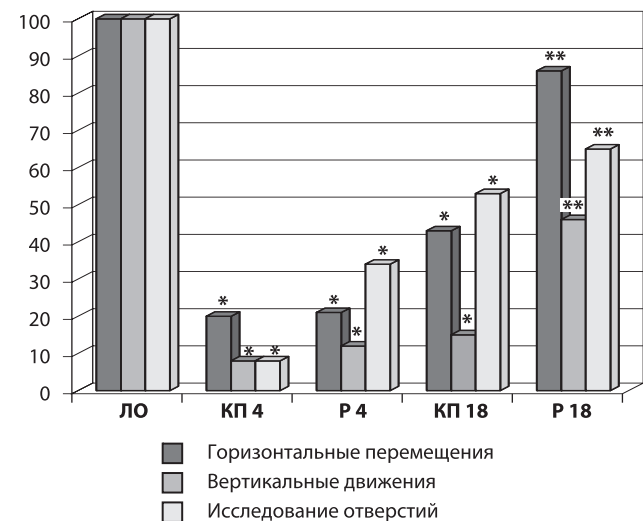


Рис. 5. Поведенческие реакции крыс с церебральной ишемией

Более активно восстановление показателей ориентировочно-исследовательского поведения происходило в группе животных, получавших Ронколейкин. Изменения показателей спонтанной двигательной активности в этой группе более выражены в восстановительном периоде — количество горизонтальных и вертикальных движений увеличилось относительно КП почти в 2 раза ( $p^{КП} < 0,05$ ), что свидетельствует о стабилизации неврологического статуса животных с церебральной ишемией. Ориентировочно-исследовательская активность животных группы Р восстановилась на 65 % относительно группы ЛО ( $p^{КП} < 0,05$ ).

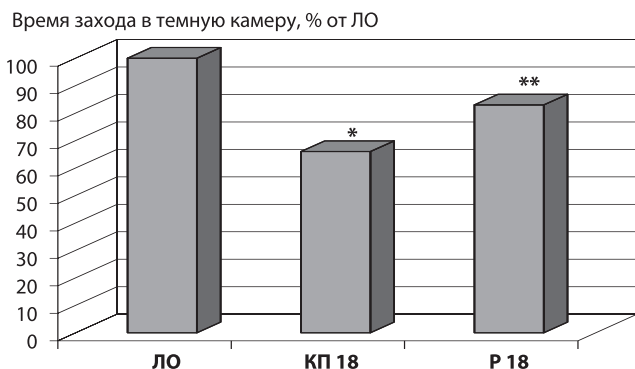


Рис. 6. Воспроизведение УРПИ у крыс с церебральной ишемией после обучения на 18 сутки

По сравнению с прочими элементами мозга, страдающими от ишемического воздействия, особую ранимость обнаруживают нейроны гиппокампа [16]. Результаты многих экспериментальных и клинических исследований показали участие гиппокампа в реализации процессов приобретения и консолидации следов памяти, реагировании на новизну обстановочных стимулов и организации ориентировочного рефлекса, т. е. в механизмах памяти и обучения и обеспечении познавательной деятельности человека и животных [11]. В экспериментальных и клинических условиях показано, что фокальная или глобальная ишемия неизменно сопровождаются поражениями гиппокампа и ведут к когнитивной патологии [1, 2].

Данные эксперимента подтверждают развитие у животных с церебральной ишемией когнитивного дефицита — в восстановительном периоде после обучения в тесте УРПИ латентное время захода в темный отсек уменьшилось на 40 % ( $p^{ЛО} < 0,01$ ). У животных, получавших Ронколейкин, отмечено увеличение латентного времени рефлекса по сравнению с группой КП, что свидетельствует о стабилизации процессов запоминания и уменьшении выраженности когнитивных нарушений ( $p^{КП} < 0,05$ ).

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что развитие церебральной ишемии на модели перевязки общих сонных артерий у крыс сопровождалось типичными патоневрологическими признаками — гибелью экспериментальных животных, проявления отека мозга, выраженного неврологического дефицита и ослабления памяти. Применение Ронколейкина в дозе 0,01 мг/кг при профилактическом режиме введения предупреждает гибель животных с церебральной ишемией и уменьшает цитотоксический отек головного мозга. При лечебном режиме

введения Ронколейкин в дозе 0,01 мг/кг достоверно снижает выраженность постинсультных неврологических и когнитивных нарушений — улучшает психоневрологический статус по шкале McGraw и показатели двигательной активности, стабилизирует процессы запоминания. Следовательно, Ронколейкин эффективно снижает выраженность локального воспаления и блокирует развитие постинсультных нейрональных нарушений, что подтверждает возможность применения его в качестве эффективного патогенетического церебропротектора.

#### Список литературы

1. Арушанян, Э. Б. Гиппокамп и нарушения познавательной деятельности / Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер // Журнал неврологии и психиатрии. — 2007. — № 7. — С. 72—77.
2. Беридзе, М. З. Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте / Беридзе М. З., Урушадзе И. Т., Шакаришвили Р. Р. // Инсульт. — 2001. — № 3. — С. 35—40.
3. Виленский, Б. С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение / Б. С. Виленский. — СПб: Фолиант, 2002. — 397 с.
4. Виничук, С. М. Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения / С. М. Виничук, Т. М. Черненко. — Киев: Комполис, 2003. — 120 с.
5. Гусев, Е. И. Глутаматная нейротрансмиссия и метаболизм кальция в норме и при ишемии головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова // Успехи физиолог. наук. — 2002. — № 33. — С. 80—93.
6. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной ишемии / [Гусев Е. И., Скворцова В. И., Журавлева Е. Ю. и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. — 1999. — № 5. — С. 55—61.
7. Жданов, Г. Н. Изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных в остром периоде ишемического инсульта / Г. Н. Жданов, М. М. Герасимова // Цитокины и воспаление. — 2006. — Т. 5, № 1. — С. 27—30.
8. Козлов, В. К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии / В. К. Козлов. — К.: «АННА-Т», 2007. — 296 с.
9. Нейроиммунопатология: Руководство / [Крыжановский Г. Н., Магаева С. В., Макаров С. В. и др.]. — М.: Изд-во НИИ общей патологии и патофизиологии, 2003. — 438 с.
10. Лукьянова, Л. Д. Энерготропное, антигипоксическое и антиоксидантное действие флавоноидов инсульта / Лукьянова Л. Д., Германова Э. Л., Лыско А. И. // Вестник РАМН. — 2007. — № 2. — С. 55—61.
11. Лурия, А. Р. Высшие корковые функции человека и их нарушения при локальных поражениях мозга / А. Р. Лурия. — М.: Медицина, 2000. — 287 с.
12. Защищающие и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота / [Манухина Е. Б., Дауни Х. Ф., Маллет Р. Т., Малышев И. Ю.] // Вестник Российской АМН. — 2007. — № 2. — С. 27—33.
13. Петрищев, Н. Е. Функциональное состояние эндотелия при ишемии-реперфузии (Обзор литературы) / Н. Е. Петрищев, Т. Д. Власов // Рос. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. — 2000. — Т. 86, № 2. — С. 148—163.
14. Arend, W. P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease / W. P. Arend // Cytokine Growth Factor Rev. — 2002. — Vol. 13, № 4—5. — P. 323—340.
15. Reduced IL-2 but elevated IL-4, IL-6, and IgE serum levels in patients with cerebral infarction during the acute stage / [Kim H. M., Shin H. Y., Jeong H. J. et al.] // J. Mol. Neurosci. — 2000. — Vol. 14(3). — P. 191—196.
16. Pulsinelli, W. A. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics / W. A. Pulsinelli // Progr Brain Res. — 1985. — № 53. — P. 29—37.

Надійшла до редакції 21.12.2010 р.



*Е. В. Супрун*

*Національний фармацевтичний університет (м. Харків)*

**Корекція ронколейкіном неврологічних та когнітивних порушень в умовах білатеральної оклюзії загальних сонних артерій у щурів**

На моделі незворотної білатеральної оклюзії загальних сонних артерій проведено вивчення психофізіологічного статусу щурів на фоні корекції рекомбінантним інтерлейкіном-2 — Ронколейкіном (0,01 мг/кг) в порівнянні з пірацетамом (200 мг/кг) та тіотриазоліном (50 мг/кг). Відзначено зниження виразності постінсультних неврологічних та когнітивних порушень — покращання показників рухової активності, психоневрологічного статусу за шкалою McGraw та відтворення рефлексу пасивного запобігання, більш ефективним був Ронколейкін.

*Ключові слова:* ІЛ-2, Ронколейкін, експериментальна церебральна ішемія.

*E. V. Suprun*

*National University of Pharmacy (Kharkiv)*

**Correction receptor antagonist for interleukin-1 of neurological and cognitive disorders in experimental ischemic stroke**

On the model of irreversible bilateral occlusion of carotid arteries was studied the psychophysiological status in rats on the background of correction recombinant interleukin-2 — Ronkoleukin (0,01 mg / kg) compared with piracetam (200mg/kg) and tiotriazolin (50 mg/kg). Marked decrease of intensity of afterischemic neurological and cognitive disorders — improvement of movement activity, psychophysiological status by the McGraw's scale and the reproduction of the reflex of passive avoidance, more effective than Ronkoleukin.

*Keywords:* IL-2, Ronkoleukin, experimental cerebral ischemia.