



ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Количественный фармако-ЭЭГ анализ активности ноотропов и их комбинаций с Мелаксеном при глобальной ишемии головного мозга у крыс**Е.В. Ганцгорн, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин***ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону**Контактная информация: Ганцгорн Елена Владимировна, gantsgorn@inbox.ru*

Посредством спектрального анализа ЭЭГ на модели глобальной церебральной ишемии у крыс изучались эффекты ноотропов и их комбинаций с Мелаксеном в условиях нарушения мозгового кровообращения. Установлено, что превентивное применение Винпоцетина с Мелаксеном значительно снижает количество летальных исходов, а также степень неблагоприятного воздействия циркуляторной ишемии на функциональное состояние головного мозга выживших животных. Полученные результаты могут быть использованы в клинической практике для лечения ишемических и нейродегенеративных заболеваний головного мозга.

Ключевые слова: фармако-ЭЭГ, церебральная ишемия, ноотропы, Мелаксен.

Введение

Метод электроэнцефалографии (ЭЭГ) очень важен для мониторинга прогрессивных изменений нейрофизиологических функций при различных типах неврологических расстройств, включая ишемию головного мозга, дисциркуляторную энцефалопатию и т.д., а также для оценки эффективности фармакотерапии подобных cerebrovasculary заболеваний.

Метод ЭЭГ, включающий в себя регистрацию и анализ биопотенциалов, динамически варьирующих на поверхности коры головного мозга (ГМ), является одним из наиболее эффективных инструментов для неинвазивного исследова-

ния функционального состояния ГМ в условиях физиологической нормы и различного рода нарушений ЦНС, а также на фоне фармакологических воздействий [6, 8].

С целью изучения ЭЭГ-эффектов психотропных лекарственных препаратов (ЛП) был разработан комплекс методических приемов, названный количественной фармако-ЭЭГ (quantitative pharmacoelectroencephalography, QPEEG). Термин «количественная фармакоэлектроэнцефалография» (КФЭЭГ) впервые был предложен Т.М. Итил в 1974 г. [17] для обозначения процесса, который включает в себя использование компьютерного анализа спонтанной

ЭЭГ и серию статистических процедур, направленных на выявление центрального действия новых ЛП, предсказание их клинического (психотропного) действия, оценку эффективной дозы и продолжительности действия после приема разовой терапевтической дозы [16].

При этом изменение показателей ЭЭГ (реорганизация спектральных характеристик электрической активности, изменение латентности и амплитуды сенсорных вызванных потенциалов в неокортексе и др.) может служить дополнительным информативным критерием эффективности фармакотерапии, в т.ч. нарушений мозгового кровообращения (НМК) [2, 16].

Ввиду широкой распространенности, тяжести течения, высоких показателей инвалидизации и смертности от НМК, максимально детальное изучение патогенетических механизмов такого рода патологии и поиск новых подходов к ее эффективному лечению является одной из актуальных задач клинической неврологии и фармакологии [9, 10, 15].

Безусловно, важное место в фармакотерапии НМК отводится нейропротекторам. Актуальным является комбинированное применение агентов первичной нейропротекции, в частности, антиоксидантов и средств вторичной защиты, к числу которых относят и ноотропы [14]. Среди антиоксидантных средств особый интерес представляет мелатонин, обладающий значительным нейроантиоксидантным действием, что оправдывает целесообразность его использования при НМК в качестве оригинального нейропротектора [3, 19].

В связи с вышеизложенным, важную задачу представляет собой всестороннее изучение действия нейропротекторов,

в т.ч. их влияния на функциональное состояние ГМ. ЭЭГ-исследованиями у разных групп ноотропов (производных пирролидина, холинергических средств, церебральных вазодилататоров, антиоксидантов) выявлены общие тенденции в изменении основных ритмов: повышение мощности α -ритма и снижение медленных Δ - и θ -ритмов. Изменения β -ритма, судя по данным литературы, не столь однозначны, однако исследователи склоняются к мнению об его усилении под влиянием ноотропов [4, 5, 7, 13].

Вместе с тем, анализ параметров КФЭЭГ очень затруднен ввиду сложной композиции отдельных характеристик спектра психотропной активности ЛП этой группы, включающей различные соотношения ноотропного действия с неспецифическими стимулирующим и анксиолитическим эффектами, методической сложностью определения спектра их действия в клинко-фармакологических исследованиях [1, 11, 12].

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 112 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г. Животные содержались в условиях вивария при естественном освещении, в пластиковых клетках размером 55×45×15 см, по 6 особей в клетке. Крысы потребляли гранулированный комбикорм и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. В эксперимент животных забирали после 7 дней карантина. Все эксперименты были выполнены в соответствии с рекомендациями по гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденными этическим комитетом РостГМУ.

В соответствии с протоколом исследования, за 14 дней до экспериментальной ишемии головного мозга (ЭИГМ) животные были разделены на 7 групп (2 контрольные и 5 опытных), по 16 крыс в каждой. Из двух контрольных групп первую составили ложнооперированные животные (группа ЛО), у которых воспроизвели все этапы операции без перевязки общих сонных артерий (ОСА), а вторую – крысы, подвергшиеся ЭИГМ (группа ИШ); обе группы получали в течение 14-ти дней физ. раствор в дозе 0,2 мл/сут внутрибрюшинно. Крысам опытных групп в течение 14-ти дней внутрибрюшинно вводились изучаемые ЛП: Пирацетам – в дозе 300 мг/кг/сут (группа П_{иш}); Мелаксен – в дозе 0,25 мг/кг/сут (группа М_{иш}); Винпоцетин – в дозе 4 мг/кг/сут (группа В_{иш}); Пирацетам в сочетании с Мелаксеном (группа ПМ_{иш}) и Винпоцетин в комбинации с Мелаксеном (группа ВМ_{иш}) (все ЛП – в вышеуказанных дозах), а затем моделировалась ЭИГМ.

В связи с тем, что одной из актуальных проблем нейрофизиологии и психофармакологии является разработка электрофизиологических критериев ишемических явлений в ГМ, которые позволяли бы дифференцировать степень тяжести состояния ЦНС, а также объективно оценивать эффективность проводимой фармакотерапии, в рамках нашего исследования была поставлена задача провести сравнительный анализ относительных значений мощностей (ОЗМ) ЭЭГ-ритмов в контрольных и опытных группах крыс до и после ЭИГМ. Для выполнения данной задачи за 5 дней до моделирования ЭИГМ всем животным в область соматосенсорной

коры и гиппокампа (симметрично справа и слева) вживлялись электроды в соответствии с атласом стереотаксических координат ГМ крысы [18], индифферентный электрод локализовался в лобной пазухе. Операции проводились под эфирным наркозом с помощью стереотаксической установки СЭЖ-4 (производства Института физиологии им. А.А. Богомольца, Украина) и микроманипуляторов для погружения микроэлектродов. Фиксация электродов производилась с помощью стоматологической пластмассы холодной полимеризации «Протакрил» на голове животного. Спектральные характеристики электрограмм мозга определялись с помощью быстрого преобразования Фурье в диапазоне 1-30 Гц. ЭЭГ животных регистрировались монополярно на 8-канальном электроэнцефалографоанализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» до и через 24 ч после моделирования ЭИГМ. Были изучены показатели ОЗМ (%) для Δ (дельта) - (1-4 Гц), θ (тета) - (5-7 Гц), α (альфа) - (8-12 Гц) и β (бета) - (13-30 Гц) частотных диапазонов ЭЭГ крыс.

ЭИГМ моделировалась путем одновременной перевязки левой и правой ОСА. Операционную рану обрабатывали 5% спиртовым раствором йода и послойно ушивали. Все хирургические процедуры проводили в стерильных условиях под тиопенталовым (120 мг/кг внутрибрюшинно) наркозом. Сутки спустя отмечали количество выживших крыс во всех группах и регистрировали у них ЭЭГ, после чего под эфирным наркозом производили эвтаназию животных.

Статистическую обработку полученных данных проводили на ПК с

использованием общепринятых методов параметрической статистики (критерий Фишера) при помощи пакета программ Statistica 6.0 (ANOVA/MANOVA) (Statsoft, USA). Статистически значимыми считали изменения при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

Проведенный анализ выживаемости крыс (табл. 1) показал, что в группе ЛО 24-часовую двухстороннюю окклюзию ОСА переживали 100% крыс. В группе ИШ (контроль II уровня) с предварительным введением физ. р-ра суточная выживаемость была минимальной и составила всего 34,8%. В течение 24 ч постишемического периода процент выживаемости в группе животных, получавших Пирацетам, отличался от группы контроля на 9,6%, составив 44,4%. На фоне введе-

ния Мелаксена и Винпоцетина показатель выживаемости через сутки после ЭИГМ был выше и равнялся 50% и 61,5%, соответственно. При превентивном введении комбинации Пирацетама и Мелаксена выживаемость крыс составила 53,3%, а при совместном введении Винпоцетина с Мелаксеном – 80,0%.

В рамках количественного анализа ЭЭГ – как до операции, так и сутки спустя после нее – было зафиксировано характерное изменение представительства частотных диапазонов на фоне применения различных ЛП в сравнении с контрольными группами крыс, получавшими физ. раствор.

Параметры ОЗМ (%) в контрольных и опытных группах крыс до операции и через 24 ч после проведения окклюзии ОСА представлены, соответственно, в табл. 2 и 3.

Таблица 1
Влияние изучаемых ЛП на показатели выживаемости крыс при ЭИГМ

Группы животных	Количество прооперированных животных	Количество животных, переживших 24-часовую двухстороннюю окклюзию ОСА	Количество животных, умерших после 24-часовой двухсторонней окклюзии ОСА	Выживаемость, %
ИШ	46	16	30	34,8
П _{иш}	36	16	20	44,4*
М _{иш}	32	16	16	50,0*
В _{иш}	26	16	10	61,5**
ПМ _{иш}	30	16	14	53,3**
ВМ _{иш}	20	16	4	80,0**

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,05$;

** – статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,01$.

Таблица 2

Показатели ОЗМ (%) в контрольных и опытных группах крыс до моделирования ЭИГМ (либо ложной операции)

Диапазон ЭЭГ Группа	Δ	θ	α	β
ЛО	26,94±0,73	35,38±1,33	15,65±0,31	18,78±0,53
ИШ	24,55±1,40*	36,91±1,17	15,35±0,57	18,48±0,50
П _{иш}	13,11±0,73** ##	36,79±1,27	22,57±0,69** ##	27,09±0,70** ##
М _{иш}	24,84±0,77*	38,47±0,39* #	15,47±0,29	19,45±0,58
В _{иш}	16,97±0,45** ##	44,74±0,52** ##	16,60±0,48	20,96±0,43* #
ПМ _{иш}	16,10±1,44** ##	40,60±0,45** ##	16,67±0,74	26,80±1,30** ##
ВМ _{иш}	19,54±0,39** ##	39,68±0,64** ##	17,64±0,37* #	21,99±0,46** ##

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с ЛО при $p \leq 0,05$;

** – статистически значимые отличия по сравнению с ЛО при $p \leq 0,01$;

– статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,05$;

– статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,01$.

Таблица 3

Показатели ОЗМ (%) в контрольных и опытных группах крыс через 24 ч после моделирования ЭИГМ (либо ложной операции)

Диапазон ЭЭГ Группа	Δ	θ	α	β
ЛО	28,94±0,84	33,80±1,80	14,71±1,33	18,39±0,56
ИШ	31,67±0,89*	25,59±1,09**	10,88±1,24**	13,89±0,59**
П _{иш}	23,92±0,84** ##	21,51±0,68** ##	16,16±0,62* ##	18,74±0,80##
М _{иш}	29,37±0,62##	26,96±0,36** #	12,06±1,22* #	15,22±0,94**
В _{иш}	26,81±1,38* ##	23,47±0,58** #	12,11±0,74**	15,55±0,68** #
ПМ _{иш}	27,83±1,21##	22,81±0,74** ##	12,66±0,29* #	19,51±0,73##
ВМ _{иш}	27,42±0,37##	32,05±0,79##	14,26±0,46#	19,13±1,33##

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с ЛО при $p \leq 0,05$;

** – статистически значимые отличия по сравнению с ЛО при $p \leq 0,01$;

– статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,05$;

– статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,01$.

Обсуждение результатов

Приведенные выше данные по показателю выживаемости крыс свидетельствуют о том, что ЭИГМ, вызванная одномоментной двусторонней необратимой перевязкой ОСА, приводила к гибели более чем половины экспериментальных животных в течение суток после операции. Превентивное курсовое применение изучаемых ЛП в разной степени повышало выживаемость крыс. Эффект применения Мелаксена был сопоставим с эффектом Пирацетама, а применение Мелаксена в комбинации с Винпоцетином оказалось более эффективным, нежели в комбинации с Пирацетамом. При этом сочетанный прием Винпоцетина с Мелаксеном в целом был наиболее эффективным: в данной опытной группе крыс количество летальных исходов было почти в 2,5 раза ($p \leq 0,01$) ниже, чем у животных группы ИШ, не получавших ЛП.

Результаты проведенного сравнительного анализа показателей ОЗМ демонстрируют, что введение на протяжении 14-ти дней исследуемых ЛП и их комбинаций определенным образом отражается на биоэлектрической активности ГМ крыс до, а также после моделируемой ЭИГМ или ложной операции.

До операции минимальные значения ОЗМ Δ -частотного диапазона наблюдались в группах $\Pi_{\text{иш}}$ и $\Pi M_{\text{иш}}$, максимальные показатели ОЗМ θ -ритма (доминирующего у крыс в норме и характеризующего нормальную активность их ГМ) отмечались в группах $B_{\text{иш}}$ и $BM_{\text{иш}}$. Быстроволновая активность наиболее выражено изменялась в экспериментальных группах, получавших комбинации исследуемых ЛП. Что касается группы $M_{\text{иш}}$, то показатели ОЗМ

в ней существенно не отличались от контрольных.

Спустя сутки после операции показатели ОЗМ всех частотных диапазонов в группе ЛО практически возвращались к исходным, а некоторые расхождения с таковыми (незначительное увеличение мощности Δ -диапазона на фоне уменьшения мощности θ - и α -частотных диапазонов) можно объяснить неполным восстановлением животных после перенесенных наркоза и оперативного вмешательства.

Нарушения со стороны функциональной активности ГМ у животных контрольной группы ИШ и всех опытных групп через 24 ч после ЭИГМ, наоборот, продолжали нарастать. Об этом свидетельствовало неуклонное снижение ОЗМ θ -частотного диапазона, представительства быстроволновой активности, а также тот факт, что несмотря на некоторое уменьшение представительства Δ -частотного диапазона, оно значительно превышало таковое у θ -ритма (это служит критерием выраженной гипоксии и подтверждает развитие ИГМ).

Исключение составляла лишь группа крыс $BM_{\text{иш}}$, предварительно получавших Винпоцетин в комбинации с Мелаксеном.

Только в ней отмечалось распределение частотных диапазонов, близкое к фоновому: хотя экспериментальные значения ОЗМ θ -, α - и β -ритмов и были несколько ниже своих первоначальных значений, но θ -частотный диапазон доминировал над Δ -частотным диапазоном. До операции в группе $BM_{\text{иш}}$ значение ОЗМ Δ -частотного диапазона было ниже, чем в группе, получавшей физ. раствор, а мощность θ -, α - и β -ритмов превышала аналогичные показатели

контрольной группы. После ИГМ в этой группе наблюдалась наибольшая сохранность ритмов и их распределения в ЭЭГ. При этом ОЗМ θ - и α -частотных диапазонов были близки, в то время как значения ОЗМ Δ -ритма даже несколько ниже, а β -ритма – выше таковых в контрольной группе ЛО. Это свидетельствовало о бодрствующем состоянии ГМ крыс этой группы и являлось важным критерием эффективности превентивного применения комбинации данных ЛП в целях нейропротекции.

Выводы

1. Анализ биоэлектрической активности ГМ целесообразно использовать для объективизации его состояния в процессе антиишемической фармакопрофилактики и проводимой противоишемической фармакотерапии, а также для разработки критериев ее эффективности в силу возможности количественно охарактеризовать динамику изменений функций ГМ.

2. Используемая модель глобальной ишемии ГМ у крыс вызывает значительное нарушение церебрального кровообращения, что отражается на динамике частотно-амплитудных показателей ЭЭГ. Параметры КФЭЭГ рационально использовать в качестве маркеров церебральной ишемии и информативных показателей для оценки особенностей влияния изучаемых ЛП на функциональное состояние ГМ.

3. На фоне применения комбинации Винпоцетина и Мелаксена происходит наиболее выраженная нормализация биоэлектрической активности ГМ крыс.

4. На модели глобальной церебральной ишемии у крыс комбинация Винпоцетина и Мелаксена способна повышать устойчивость ГМ к гипоксии, а

также оказывать благоприятное влияние на его биоэлектрическую активность. В связи с этим, при фармакотерапии и фармакопрофилактике острых НМК целесообразным, на наш взгляд, является включение в стандартный перечень применяемых лекарственных средств нейрого르몬а мелатонина.

Список литературы

1. *Авруцкий Г.Я., Нисс А.И.* Фармакология ноотропов (экспериментальное и клиническое изучение) // Сб. трудов НИИ фармакологии АМН СССР. - М. 1989. С. 112.
2. *Арушанян Э.Б.* Лекарственное улучшение познавательной деятельности мозга. – Ставрополь: СтГМА. 2004. С. 401.
3. *Арушанян Э.Б.* Изучение психотропной активности гормона эпифиза мелатонина – оригинальное направление наших исследований // Эксперим. и клин. фармакол. 2007. № 6. С. 55-60.
4. *Воронина Т.А.* Гипоксия и память. Особенности эффектов и применения ноотропных препаратов // Вестник Российской АМН. 2000. № 9. С. 27-34.
5. *Воронина Т.А.* Отечественный препарат нового поколения мексидол – основные эффекты, механизм действия, применение. – М. 2005. С. 20.
6. *Гринштейн А.Б., Шнайдер Н.А.* Применение метода компьютерной ЭЭГ при некоторых заболеваниях ЦНС // Методические рекомендации для системы последипломного образования врачей. - Красноярск: ГОУ ВПО КрасГМА. 2007. С. 45.
7. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия мозга. - М.: Медицина. 2001. С. 328.
8. *Зенков Л.Р.* Клиническая электроэнцефалография с элементами эпилептологии. – М.: МЕДпресс-информ. 2004. С. 367.
9. *Исайкин А.И.* Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта // Трудный пациент. 2010. № 4. С. 21-24.
10. *Ларина Н.В., Самохвалова В.В.* Ишемический инсульт: генетические и возрастные аспекты // Пробл. старения и долголетия. 2012. Т. 21. № 1. С. 73-96.
11. *Мосолов С.Н.* Основы психофармакологии. – М: Восток. 1996. С. 288.

12. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Давыдова И.А., Телешова Е.С. «Быстрые» и «медленные» компоненты психотропного действия препаратов с ноотропными свойствами // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2000. Т. 100. № 6. С. 33-37.
13. Панюшкина С.В., Аведисова А.С. Изменение узкополосных составляющих спектра ЭЭГ при действии ноотропов // Эксперим. и клин. фармакол. 1992. № 3. С. 14-17.
14. Румянцева С.А., Афанасьев В.В., Силина Е.В. Патолофизиологическая основа комплексной нейропротекции при ишемии мозга // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2009. Т. 109. № 3. С. 64-68.
15. Demaerschalk B.M., Hwang H.M., Leung G. US cost burden of ischemic stroke: a systematic literature review // Am. J. Manag. Care. 2010. V. 16 (7). P. 525-533.
16. Hammond D.C. Quantitative electroencephalography patterns associated with medical conditions // Biofeedback. 2006. V. 34(3). P. 87-94.
17. Itil T.M. Quantitative pharmaco-electroencephalography. // Psychotropic Drugs and the Human EEG. Modern Problems in Pharmacopsychiatry. - New York: Karger. 1974. V. 8. P. 43-75.
18. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th Edition. - Published by Elsevier Inc. 2007. P. 451.
19. Tan D.X., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L.J., Reiter R.J. One molecule, many derivatives: a neverending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? // J. Pineal. Res. 2007. V. 42, P. 28-42.

Quantitative pharmaco-EEG analysis of nootropics and nootropics with Melaxen combination activity at global cerebral ischemia in rats

E.V. Gantsgorn, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin

On the base of EEG spectral analysis we've studied the effects of nootropics and its combinations with Melaxen during cerebral blood flow disturbances in a rat global cerebral ischemia model. It was established that preventive combined Vinpocetine and Melaxen usage significantly reduces the number of deaths and circulatory ischemia adverse effects influence on survived experimental animals' brain functional state. The obtained results can be used in clinical practice for the treatment of ischemic and neurodegenerative brain diseases.

Key words: pharmaco-EEG, cerebral ischemia, nootropics, Melaxen.