УДК 616.831-001-005.4-036.11-085

Н.В. Цыган[1], А.П. Трашков[2]

# Повреждение головного мозга и нейротрофические механизмы его защиты на модели острой церебральной гипоксии

[1]Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург
[2]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

***Резюме.*** *Исследованы функциональное состояние головного мозга и нейротрофические механизмы его защиты при острой церебральной гипоксии. Работа выполнена на 186 самцах-альбиносах серых крыс. Острую тромбоэмболию с последующей окклюзией в бассейне правой сонной артерии выполняли 150 крысам, после чего 75 животных не получали лечение (группа «тромбоэмболия»), 75 животных получали цитофлавин в течение 10 сут (группа «лечение»). Ежедневно выполняли неврологическое обследование животных, на 1-е, 3-и, 10-е сут оценивали уровни биомаркеров нервной ткани и факторов роста в цитолизате головного мозга (NSE, NGF, VEGF-A) и в плазме крови (NSE, GFAP, S100β, VEGF-A, IGF-1) крыс. Установлено, что в группе «тромбоэмболия» концентрация биомаркера нейронов NSE повышалась в головном мозге на 1-е сут, в плазме крови – на 3-и сут (достоверно ниже в группе «лечение»), уровни биомаркеров нейроглии в плазме крови повышались на 1-е (GFAP), 3-и и 10-е (S100β) сут (достоверно ниже в группе «лечение»). В обеих группах концентрации факторов превысили референтные значения на 3-и сут (NGF в цитолизате головного мозга) и на 10-е сут (VEGF-A в плазме крови и цитолизате головного мозга, IGF-1 в плазме крови). В группе «лечение» уровень VEGF-A в цитолизате головного мозга достоверно превышал референтные значения в 1-е и 3-и сут с последующим значимым увеличением с 3-х по 10-е сут, концентрация IGF-1 в плазме крови на 10-е сут была достоверно выше, чем в группе «тромбоэмболия». Таким образом, острая церебральная гипоксия приводит к острому и отсроченному повреждению нейронов и нейроглии, а также преимущественно отсроченной активации синтеза факторов роста нервной ткани. Применение цитофлавина оказало пролонгированное мультимодальное нейропротективное влияние, сопровождавшееся ранней активацией нейротрофических механизмов после острого гипоксического повреждения головного мозга.*

***Ключевые слова:*** *острая церебральная гипоксия, биомаркеры нервной ткани, факторы роста нервной ткани, нейротрофические механизмы, нейропротекция, цитофлавин, головной мозг.*

**Введение.** Современные представления о защите нервной ткани (нейропротекции) основаны на многообразии внутриклеточных механизмов и межклеточного взаимодействия нейронов, нейроглии, эндотелиоцитов и других клеток. Одним из универсальных механизмов защиты на клеточном и тканевом уровнях является усиление синтеза и активация факторов роста, являющихся полифункциональными регуляторами. Учитывая высокую степень дифференцированности нейронов и клеток глии, а также важность поддержания функций гематоэнцефалического барьера, для защиты центральной нервной системы особенно актуальны нейротрофические механизмы, основанные на действии факторов роста нервной ткани [6].

Активация нейротрофических механизмов доказана для острых и хронических патологических состояний нервной системы, в том числе для гипоксического и ишемического повреждения. Применительно к различным клеткам и тканям факторы роста имеют сетевой взаимодополняющий характер взаимодействия. Поэтому факторы роста нервной ткани включают в себя не только нейротрофины (например, фактор роста нервов, (nerve growth factor, NGF)), семейство глиального нейротрофического фактора, семейство цилиарного нейротрофического фактора, но и другие факторы роста, в том числе сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor, VEGF), инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor, IGF) [2, 6, 33].

Первым из факторов роста был открыт в 1951 г. NGF [30]. В центральной нервной системе NGF синтезируется астроцитами и обладает нейротрофическими эффектами [15, 23]. В головном мозге VEGF синтезируется астроцитами, эндотелиоцитами и, в меньшей степени, нейронами. За пределами центральной нервной системы источниками VEGF являются различные клетки, включая макрофаги и тромбоциты [3, 16, 18]. VEGF участвует в развитии и восстановлении центральной нервной системы, стимулирует ангиогенез, пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов гематоэнцефалического барьера, а также ингибирует их апоптоз [22, 29, 34]. Внутрижелудочковое введение рекомбинантного человеческого VEGF дозозависимо повышает плотность микрососудов у крыс [26]. Эффекты VEGF реализуются через четыре типа рецепторов, широко представленных в головном мозге млекопитающих [39]. Внутриклеточные каскады,

опосредуемые рецепторами к VEGF, включают фосфолипазу С, диацилглицерол и MAP-киназу [27]. Важно отметить, что источниками VEGF также являются эндотелиоциты и большое количество паравазальных клеток, включая макрофаги [3].

IGF-1 в головном мозге синтезируется клетками глии, эндотелиоцитами микроциркуляторного русла, нейронами [20, 37]. Кроме этого, IGF-1 путем трансцитоза может транспортироваться в головной мозг через эндотелиоциты гематоэнцефалического барьера [21]. При развитии нервной системы наиболее высокие концентрации IGF-1 определяются в зрительном тракте, таламусе и мозжечке, а рецептор к IGF-1 – во всех отделах ЦНС [2]. IGF-1 регулирует пролиферацию, дифференцировку, сохранение нейронов и клеток глии, стимулирует синаптогенез и миелинизацию [19, 24], оказывает антиапоптическое действие на нейроны за счет активации фосфатидилинозитол-3-киназного пути [37, 38, 40], а также оказывает влияние на когнитивные функции у взрослых млекопитающих [31].

Гипоксия головного мозга в большинстве случаев связана с изменениями системной гемодинамики и ауторегуляции мозгового кровотока, которые встречаются в клинической и хирургической практике [10]. При хронической церебральной гипоперфузии VEGF синтезируется преимущественно эндотелиоцитами гематоэнцефалического барьера [25]. В то же время, гипоксия центральной нервной системы сопровождается повышением экспрессии нейронами рецепторов к VEGF, мРНК VEGF и собственно молекул VEGF, который оказывает нейропротективное влияние [27, 39]. При гипоксическом и ишемическом повреждении головного мозга IGF-1 защищает нейроны, что может быть связано с активацией антиапоптических механизмов [24, 32].

В настоящее время для изучения состояния нервной ткани широко используют биомаркеры NSE (neuron specific enolase, нейронспецифическая енолаза), GFAP (glial fibrillary acidic protein, глиальный фибриллярный кислый белок) и белок S100β [4, 17, 36]. Экспериментальное изучение уровней биомаркеров нервной ткани в цитолизате головного мозга и плазме крови лабораторных животных обладает высокой специфичностью вследствие отсутствия сопутствующей соматической патологии.

Для лечения острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения, уменьшения повреждения головного мозга при кардиохирургических операциях широко используют комбинацию янтарной кислоты, инозина, рибофлавина и никотинамида, которые входят в структуру цитофлавина и улучшают энергетический обмен клетки на различных уровнях [5, 7–9]. Нейрохимический анализ механизмов цитопротективного действия цитофлавина при гипоксии головного мозга представляет интерес для клинической медицины – неврологии, нейрохирургии, кардиологии и кардиохирургии.

**Цель исследования.** Исследование функционального состояния головного мозга и нейротрофических механизмов его защиты при острой церебральной гипоксии в эксперименте.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 186 самцах-альбиносах серых крыс массой тела 215–230 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» Российской академии медицинских наук (Ленинградская область). Перед проведением исследования все крысы в течение 14 сут содержались в карантинном блоке вивария для исключения из эксперимента животных с соматической и/или инфекционной патологией.

Моделирование острой гипоксии головного мозга производили путем введения в правую сонную артерию 0,3 мл 75% взвеси тромба, гомогенизированного в стеклянном гомогенизаторе, в физиологическом растворе. Тромб получали из крови крысы-донора. Цельную кровь без антикоагулянтов оставляли на 40 мин в стеклянной пробирке. После этого образовавшуюся сыворотку удаляли, а тромб подвергали гомогенизированию. Под общим золетиловым наркозом производили обнажение правой сонной артерии, мобилизировали ее и устанавливали катетер, через который вводили тромботическую массу со скоростью 1,0 мл в мин. После этого перевязывали сонную артерию и послойно ушивали рану. Преимуществом выбранной модели является сочетание острой гипоксии и церебральной эмболии – ключевых факторов, определяющих состояние головного мозга при кардиальной патологии, операциях на сердце и грудной аорте [1, 10, 12].

Включенные в эксперимент крысы были разделены путем рандомизации на четыре группы:

«Контроль» (n=20) – интактные животные («физиологическая норма»).

«Операция» (n=16) – животные, которым выполняли катетеризацию правой сонной артерии с ее последующей перевязкой без введения тромботической массы.

«Тромбоэмболия» (n=75) – животные, которым выполняли катетеризацию правой сонной артерии с последующим интраартериальным введением тромботической массы и перевязкой артерии.

«Лечение» (n=75) – животные, которым выполняли катетеризацию правой сонной артерии с последующим интраартериальным введением тромботической массы и перевязкой артерии. Всем крысам этой группы в течение 10 сут от момента искусственной тромбоэмболии проводили инфузионную терапию цитофлавином (общество с ограниченной ответственностью «НТФФ ПОЛИСАН», Россия). Раствор цитофлавина (0,2 мл цитофлавина и 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида) вводили ежедневно однократно в объеме 0,3 мл внутривенно в хвостовые вены крыс при помощи инфузионного насоса со скоростью 0,5 мл в мин.

Функциональные нарушения в нервной системе оценивали путем неврологического обследования

животных и определения концентраций биомаркеров нервной ткани и факторов роста в плазме крови, цитолизате головного мозга крыс.

Неврологическое обследование интактных крыс проводили в день включения в исследование, в других группах его выполняли непосредственно перед манипуляциями и в последующем ежедневно до выведения из эксперимента. Объем обследования включал оценку тонуса хвоста, туловищной атаксии при движении по горизонтальной плоскости, отставания конечностей при движении по горизонтальной плоскости, противодействия при поочередном разгибании конечностей. Каждый параметр оценивали по трехбалльной шкале:

– тонус хвоста: не изменен (2), снижен (1), атония (0);

– туловищная атаксия при движении по горизонтальной плоскости: отсутствует (2), умеренная (1), значительная (0);

– отставание контрлатеральных конечностей при движении по горизонтальной плоскости: отсутствует в обеих конечностях (2), умеренное в одной или двух конечностях (1), выраженное в одной или двух конечностях (0);

– противодействие при поочередном разгибании контрлатеральных конечностей: сохранено в обеих конечностях (2), умеренно снижено в одной или двух конечностях (1), значительно снижено в одной или двух конечностях (0).

Взятие крови у животных производили путем транскутанной пункции сердца под эфирным наркозом в вакуумные системы «Monovette» («Sarstedt», Германия) с этилдиаминтетраацетатом в качестве антикоагулянта. Кровь подвергали центрифугированию с ускорением 240 g в течение 7 мин для получения обогащенной тромбоцитами плазмы. Последнюю переносили в пластиковые пробирки и подвергали дополнительному центрифугированию с ускорением 1200 g в течение 15 мин, после чего обедненную тромбоцитами плазму переносили в криопробирки и хранили при температуре –20°С до проведения лабораторных исследований.

После процедуры взятия крови животных подвергали эвтаназии путем дополнительной ингаляции паров эфира. Немедленно после эвтаназии производили взятие образцов головного мозга и подвергали их обработке по методике А.М. Щербакова с соавт. [13] для подготовки к иммуноферментному анализу.

Взятие биологического материала у крыс в группах «тромбоэмболия» и «лечение» осуществляли на 1-е (n=15), 3-и (n=15) и 10-е (n=15) сут, у животных групп «контроль» и «операция» – на 10-е сут после моделирования острой церебральной гипоксии.

Оценку содержания биомаркеров нервной ткани (NSE, GFAP, S100β) и факторов роста (NGF, VEGF-A, IGF-1) в плазме крови и цитолизате головного мозга осуществляли иммуноферментным методом при помощи коммерческих наборов в соответствии с инструкцией фирмы-производителя («Cusabio», Китай).

В ходе исследования применяли следующие процедуры и методы статистического анализа: определение числовых характеристик переменных; оценку соответствия эмпирического закона распределения количественных переменных теоретическому закону нормального распределения по критерию Шапиро – Уилка; оценку значимости различий количественных показателей в независимых выборках по U-критерию Манна – Уитни; оценку степени влияния качественного фактора на дисперсию количественных показателей с использованием дисперсионного рангового метода ANOVA Kruskal-Wallis H-test (при числе групп более двух); оценку силы и направления связи между количественными показателями с использованием непараметрического коэффициента корреляции Кендалла. Для оценки влияния нескольких качественных факторов на дисперсию количественных показателей использовали многофакторный дисперсионный анализ Factorial ANOVA (с расчетом суммы квадратов отклонения SS и степени влияния фактора на дисперсию показателя отклика $K_{фактора}$). Проверку гипотезы о происхождении групп, сформированных по качественному признаку, из одной и той же популяции проводили на основе построения таблиц сопряжённости наблюдаемых и ожидаемых частот, применяли критерий Pearson Chi-square, метод максимального правдоподобия (в случаях его неустойчивости использовался двусторонний Fisher exact test) [14]. Описание количественных признаков выполняли с использованием медианы, нижнего и верхнего квартилей. При описании качественных признаков кроме относительных величин частоты был также рассчитан 95% доверительный интервал (ДИ) вероятности. Нулевая статистическая гипотеза отвергалась при уровне значимости $p<0,05$. Статистический анализ осуществляли с использованием пакета STATISTICA 8.0.

**Результаты и их обсуждение.** Хирургические манипуляции на магистральной артерии шеи, тромбоэмболия и последующая окклюзия в бассейне сонной артерии приводили к острому повреждению головного мозга. Следствием этого явился высокий показатель летальности крыс в группах «тромбоэмболия» и «лечение», что отражает напряженность использованной модели (табл. 1).

Статистически значимых отличий по уровню летальности между группами «тромбоэмболия» и «лечение» не было выявлено в течение всего эксперимента, что свидетельствует о безопасности и хорошей переносимости цитофлавина.

Неврологическое обследование животных не выявило признаков нарушений функций нервной системы в группе «контроль», а также позволило установить очаговую неврологическую симптоматику у крыс в других группах (табл. 2).

Результаты неврологического обследования, наряду с анализом уровня летальности, подтверждают обоснованность выбора и напряженность использо-

*Таблица 1*

**Летальность крыс после острой тромбоэмболии и окклюзии в бассейне правой сонной артерии**

| Период наблюдений | | Группы животных | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | «Контроль» (N=20) | «Операция» (N=16) | «Тромбоэмболия» (N=75) | «Лечение» (N=75) |
| 1 ч | n; %; 95% [ДИ] | – | 3; 18,8; [4,1–45,7] | 17; 22,7; [13,8–33,8] | 16; 21,3; [12,7–32,3] |
| 1 сут | n; %; 95% [ДИ] | – | 1; 6,3;[0,2–30,2] | 12; 16,0; [8,6–26,3] | 12; 16,0; [8,6–26,3] |
| >1 сут | n; %; 95% [ДИ] | – | – | 1; 1,3; [0,0–7,2] | 2; 2,7; [0,3–9,3] |
| 0–10 сут | n; %; 95% [ДИ] | – | 4; 25,0; [7,3–52,4] | 30; 40,0; [28,9–52,0] | 30; 40,0; [28,9–52,0] |

**Примечание:** N – общее количество животных в группе; n – количество погибших животных в группе; % – процент погибших животных в группе.

*Таблица 2*

**Результаты неврологического обследования крыс на 1–10 сут после острой тромбоэмболии и окклюзии в бассейне правой сонной артерии**

| Группа животных | | Количество животных с признаками нарушения функций нервной системы в течение периода наблюдения | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Снижение тонуса хвоста | Туловищная атаксия | Отставание контрлатеральных конечностей | Нарушение противодействия разгибанию контрлатеральных конечностей |
| «Операция» (N=12) | n; %; 95% [ДИ] | 8; 66,6; [34,9–90,1] | 3; 25; [5,4–57,2] | 3; 25; [5,4–57,2] | 8; 66,6; [34,9–90,1] |
| «Тромбоэмболия» N=46) | n; %; 95% [ДИ] | 40; 87; [73,7–95,1] | 38; 82,6; [68,6–92,2] | 36; 78,3; [63,6–89,1] | 42; 91,3; [79,2–97,6] |
| «Лечение» (N=47) | n; %; 95% [ДИ] | 37; 78,7; [64,3–89,3] | 34; 72,3; [57,4–84,4] | 38; 80,9; [66,7–90,9] | 41; 87,2; [74,3–95,2] |

**Примечание:** N – общее количество животных в группе; n – количество животных с признаками нарушения функций нервной системы в группе; % – процент животных с признаками нарушения функций нервной системы в группе.

ванной экспериментальной модели гипоксического повреждения головного мозга. Качество выполнения эксперимента дополнительно зафиксировано отсутствием признаков нарушений функций нервной системы у крыс группы «контроль». Анализ уровня летальности и результатов неврологического обследования свидетельствуют о связи хирургических манипуляций и прекращения кровотока по сонной артерии с развитием мозговой дисфункции, значительно утяжеляемой искусственной тромбоэмболией. Существенных различий результатов неврологического обследования в группах «тромбоэмболия» и «лечение» не было.

Результаты лабораторной оценки биомаркеров нервной ткани представлены на рисунках 1–4.

В качестве референтных значений концентраций биомаркеров нервной ткани использовали показатели группы «контроль», сопоставимые с данными литературы (в крови: NSE ~ 1,7 мкг/л, GFAP ~ 80 пг/мл, S100β ~ 0,4 пг/л) [35, 36].

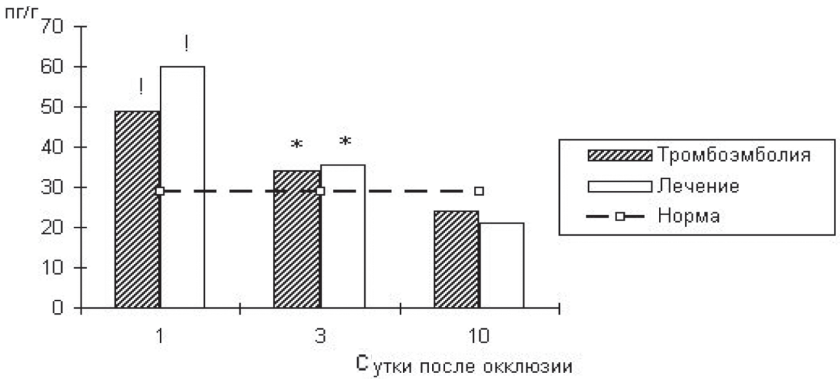


*Рис. 1.* Динамика концентрации NSE в цитолизате головного мозга (на рисунке отражены медианы; референтные значения – 29,0 [21,0; 39,5] пг/г). Достоверные отличия: ! – от нормы, * – от предыдущего значения в группе

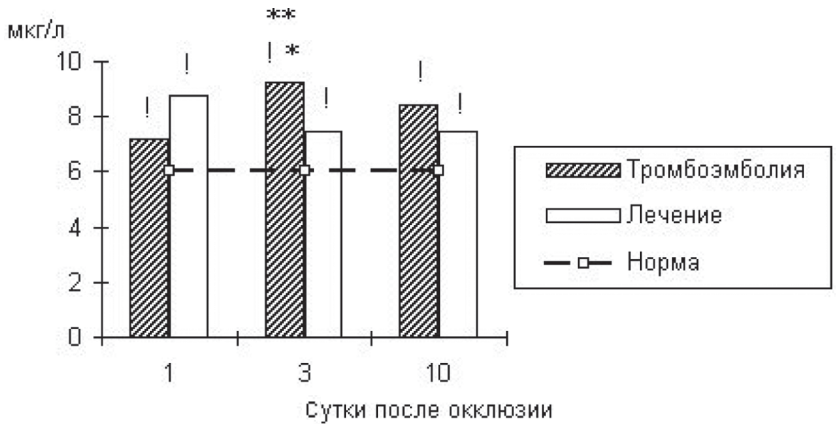


*Рис. 2.* Динамика концентрации NSE в плазме крови (на рисунке отражены медианы; референтные значения – 6,0 [5,65; 6,6] мкг/л). Достоверные отличия: ! – от нормы, * – от предыдущего значения в группе, ** – группы «тромбоэмболия» от группы «лечение»

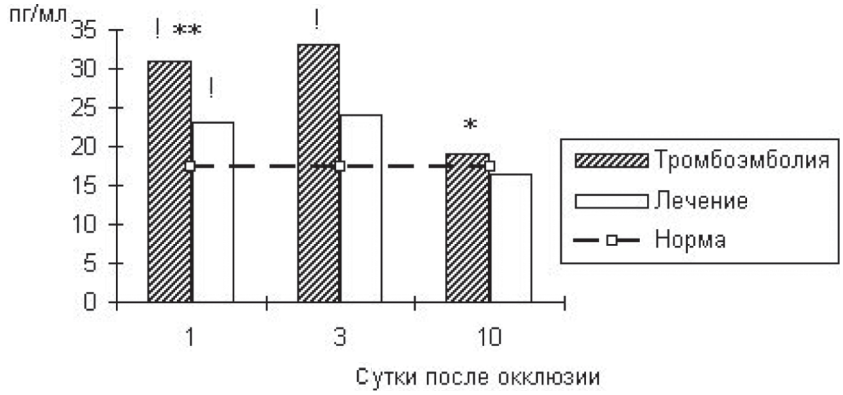


*Рис. 3.* Динамика концентрации GFAP в плазме крови (на рисунке отражены медианы; референтные значения – 19,0 [14,5; 22,0] пг/мл). Достоверные отличия: ! – от нормы, * – от предыдущего значения в группе, ** – группы «тромбоэмболия» от группы «лечение»

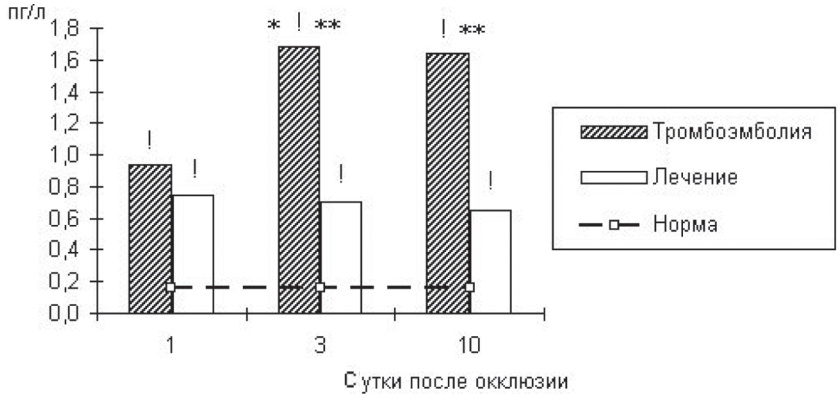


*Рис. 4.* Динамика концентрации S100β в плазме крови (на рисунке отражены медианы; референтные значения – 0,16 [0,12; 0,18] пг/л). Достоверные отличия: ! – от нормы, * – от предыдущего значения в группе, ** – группы «тромбоэмболия» от группы «лечение»

У крыс группы «операция» уровни биомаркеров нейронов и нейроглии на 10-е сут не отличались от референтных значений, что свидетельствует об отсутствии остроченных изменений головного мозга после хирургических манипуляций и перевязки сонной артерии без введения тромботической массы.

В исследуемых группах («тромбоэмболия» и «лечение») уровень NSE в цитолизате головного мозга повышался только на 1-е сут, в плазме крови кон-

центрации NSE были достоверно выше референтных значений во всех оцененных точках. На 3-и сут уровень NSE в плазме крови крыс группы «лечение» был ниже, чем в группе «тромбоэмболия». Такая динамика концентраций NSE может характеризовать острое и отсроченное повреждение нейронов, а также уменьшение его степени при лечении цитофлавином.

Повышение содержания GFAP в плазме крови на 1-е сут оказалось достоверным в группе крыс «тромбоэмболия» как по отношению к референтным значениям, так и в сравнении с группой «лечение». Аналогичные различия имели уровни S100β в плазме крови на 3-и и 10-е сут. Особенности динамики концентраций биомаркеров могут быть связаны с различной вовлеченностью клеток нейроглии в патологический процесс: GFAP отражает состояние астроцитов [28], S100β – преимущественно астроцитов, но также и других клеток нейроглии, включая олигодендроциты [4]. Многофакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние времени на динамику уровня GFAP в плазме крови ($K_{времени}$=14,2%, SS=1211, p=0,002; $K_{ошибки}$=79%, SS=6694), что подтверждает острый характер повреждения астроцитов при нарушении церебральной перфузии (см. рис. 3).

Полагаем, что нарушение перфузии в сонной артерии сопровождается острым и отсроченным повреждением и/или активацией нейроглии. Учитывая представленные ниже сведения о синтезе факторов роста клетками глии и неизменности уровней большинства факторов роста в 1-е и 3-и сут, повышение биомаркеров глии в 1-е и 3-и сут расценивали как признак повреждения нейроглии.

Применение цитофлавина способствовало уменьшению как острого, так и отсроченного повреждения клеток нейроглии. Лечение и его длительность оказали достоверное влияние на динамику уровня S100β в плазме крови ($K_{лечения}$=30,7%, SS=6,82, p<0,001; $K_{времени\ и\ лечения}$=11,4%, SS=2,53, p=0,002; $K_{ошибки}$=56%, SS=12,4), что подтверждает пролонгированное нейропротективное влияние цитофлавина на клетки глии.

В качестве референтных значений концентраций факторов роста использовали показатели группы «контроль». Результаты лабораторной оценки факторов роста нервной ткани представлены на рисунках 5–8.

Использованная в исследовании методика оценки концентраций факторов роста в цитолизате головного мозга позволяет считать их специфичными для нерв-

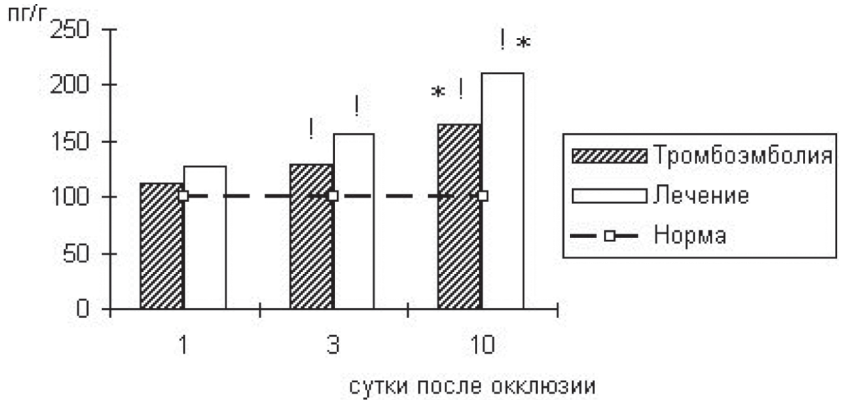


*Рис. 5.* Динамика концентрации NGF в цитолизате головного мозга (на рисунке отражены медианы; референтные значения – 100,9 [92,65; 112,05] пг/г). Достоверные отличия: ! – от нормы, * – от предыдущего значения в группе

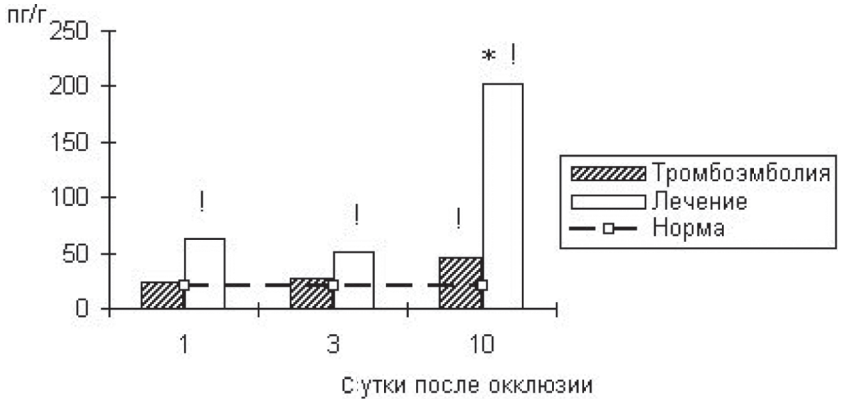


*Рис. 6.* Динамика концентрации VEGF-A в цитолизате головного мозга (на рисунке отражены медианы; референтные значения – 20,7 [17,7; 31,35] пг/г). Достоверные отличия: ! – от нормы, * – от предыдущего значения в группе

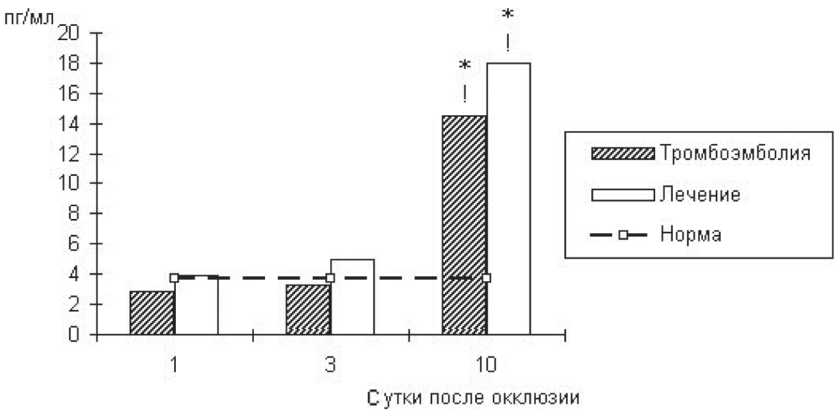


*Рис. 7.* Динамика концентрации VEGF-A в плазме крови (на рисунке отражены медианы; референтные значения – 3,7 [2,24; 12,82] пг/мл). Достоверные отличия: ! – от нормы, * – от предыдущего значения в группе

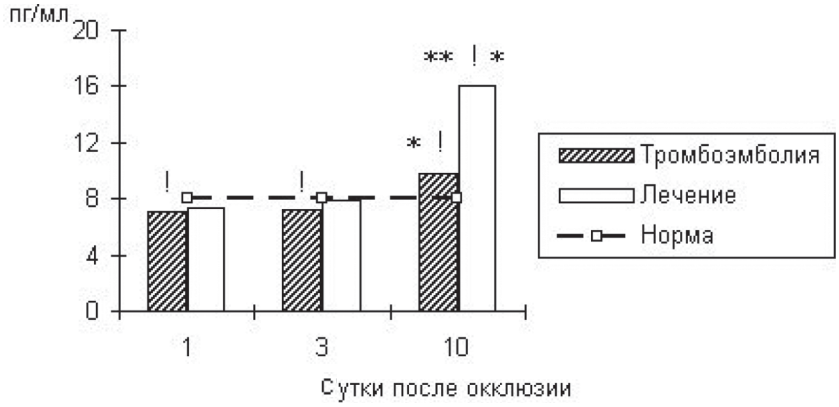


*Рис. 8.* Динамика концентрации IGF-1 в плазме крови (на рисунке отражены медианы; референтные значения – 8,0 [7,55; 8,85] пг/мл). Достоверные отличия: ! – от нормы, * – от предыдущего значения в группе, ** – группы «тромбоэмболия» от группы «лечение»

ной ткани. Ввиду отсутствия признаков сопутствующей соматической патологии у обследованных животных изменения уровней факторов роста в плазме крови оценивали как специфичную реакцию на повреждение нервной системы. На 10-е сут уровни факторов роста в группе «операция» почти соответствовали референтным значениям, в исследуемых группах – достигали максимальных значений, что подтверждает связь активации нейротрофических механизмов с острым гипоксическим повреждением головного мозга.

В группе «тромбоэмболия» референтные значения концентраций факторов роста были превышены к 3-м сут (NGF в цитолизате головного мозга) и к 10-м сут (VEGF-A в плазме крови и цитолизате головного мозга, IGF-1 в плазме крови). Учитывая основные источники факторов роста (NGF – астроциты; VEGF-A, IGF-1 – астроциты, эндотелиоциты, нейроны), динамика их уровней может объясняться усилением синтеза факторов роста в астроцитах на 3-и сут, в эндотелиоцитах и нейронах – на 10-е сут. Многофакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние времени на изменение концентрации NGF в цитолизате головного мозга ($K_{времени}$=34,8%, SS=83565; p=0,027; $K_{ошибки}$=59,3%, SS=142278), VEGF-A в цитолизате головного мозга ($K_{времени}$=19,4%, SS=163712; p<0,001; $K_{ошибки}$=72,5%, SS=611690), VEGF-A в плазме крови ($K_{времени}$=21%, SS=17470; p<0,001; $K_{ошибки}$=78,9%, SS=65720), IGF-1 в плазме крови ($K_{времени}$=27%, SS=585; p<0,001; $K_{ошибки}$=65%, SS=1408), что подтверждает преимущественно отсроченное усиление синтеза факторов роста. Прямая корреляционная связь между уровнями IGF-1 и VEGF-A в плазме крови (r=0,52; p<0,001) может отражать синхронность активации нейротрофических механизмов.

В исследуемых группах повышение уровней факторов роста на 3-и и 10-е сут сопровождалось уменьшением повреждения нейронов (снижением концентрации NSE в цитолизате головного мозга на 3-и сут) и нейроглии (снижением концентрации GFAP в плазме крови на 10-е сут). Результаты корреляционного анализа свидетельствуют об обратных корреляционных связях между уровнями факторов роста и биомаркеров клеток нервной ткани (VEGF-A в плазме крови и GFAP: r = –0,23, p<0,001; IGF-1 и GFAP:

r = –0,14, p=0,03; IGF-1 и NSE в цитолизате головного мозга: r = –0,18, p=0,008), что подтверждает уменьшение повреждения клеток нервной ткани на фоне активации нейротрофических механизмов защиты головного мозга при остром нарушении церебральной перфузии.

Динамика концентраций факторов роста в исследуемых группах была схожа, при этом во всех контрольных точках медианы уровней факторов роста были выше в группе «лечение». Уровень VEGF-A в цитолизате головного мозга в группе «лечение» достоверно превышал референтные значения в 1-е и 3-и сут с последующим значимым увеличением с 3-х по 10-е сут. Изолированное повышение концентрации VEGF-A в цитолизате головного мозга в 1-е сут может свидетельствовать об улучшении синтеза этого фактора роста астроцитами в результате нейропротективного влияния цитофлавина. По данным Lafuente J.V. et al. [29], повышение проницаемости сосудов под влиянием VEGF может способствовать развитию отека головного мозга, однако его лабораторные (по результатам исследования биомаркеров нервной ткани) и неврологические (по результатам неврологического обследования) признаки отсутствовали у животных в течение всего периода наблюдения.

В отличие от группы «лечение», в группе «тромбоэмболия» было установлено достоверное снижение уровня IGF-1 в плазме крови (по сравнению с референсными значениями) на 1-е и 3-и сут, что в отсутствие значимого снижения уровней NGF и VEGF-A может свидетельствовать о недостаточной активации нейронов и/или эндотелиальной дисфункции в отсутствие фармакологической нейропротекции.

Достоверные различия между концентрациями факторов роста у животных исследуемых групп были установлены только для уровня IGF-1 в плазме крови на 10-е сут (выше в группе «лечение»), что позволяет предположить активацию нейротрофических механизмов в эндотелиоцитах на фоне лечения цитофлавином. IGF-1 защищает нейроны от апоптоза, активирует фосфатидилинозитол-3-киназный путь, усиливающий антиапоптотические эффекты белков суперсемейства Bcl-2 (Bcl-2 и Bcl-xL) [11, 24, 32, 37]. Таким образом, лекарственно обусловленное улучшение синтеза IGF-1, возможно, уменьшает программированную гибель клеток нервной ткани при недостаточности кровоснабжения головного мозга.

**Заключение.** Острая церебральная гипоксия сопровождается острым и отсроченным повреждением нейронов и нейроглии, а также преимущественно отсроченной активацией нейротрофических механизмов защиты головного мозга. Применение цитофлавина для лечения последствий острой церебральной гипоксии оказало пролонгированное мультимодальное нейропротективное влияние, с первых суток сопровождавшееся улучшением нейротрофической защиты. С учетом данных литературы, полученные результаты позволяют предположить, что в основе фармакологической нейропротекции при церебральной гипоксии может лежать защита от острого повреждения клеток нервной ткани, а также ранняя активация нейротрофических механизмов, ингибирующих отсроченное повреждение и, возможно, программированную гибель нейронов и нейроглии.

## Литература


1. Бокерия, Л.А. Цереброваскулярные расстройства у больных с коронарным шунтированием / Л.А. Бокерия [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии. – 2008. – № 3. – С. 90–94.
2. Гомазков, О.А. Нейропептиды и ростовые факторы мозга / О.А. Гомазков. – М., 2002. – 240 с.
3. Киселева, Е.П. Фактор роста сосудистого эндотелия и иммунная система / Е.П. Киселева [и др.] // Успехи соврем. биол. – 2009. – Т. 129, № 4. – С. 1–12.
4. Одинак, М.М. Белок S100 – биомаркер повреждения головного мозга / М.М. Одинак [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2011. – № 1. – С. 210–214.
5. Одинак, М.М. Оценка эффективности цитофлавина у больных в остром периоде ишемического инсульта / М.М. Одинак [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии. – 2010. – № 12. – С. 29–36.
6. Одинак, М.М. Факторы роста нервной ткани в центральной нервной системе / М.М. Одинак, Н.В. Цыган. – СПб.: Наука, 2005. – 157 с.
7. Пирадов, М.А. Синдром полиорганной недостаточности при тяжелых формах инсульта: клинико-морфологическое исследование / М.А. Пирадов [и др.] // Невр. журн. – 2006. – Т. 11, № 5. – С. 9–13.
8. Румянцева, С.А. Энергокоррекция и качество жизни при хронической ишемии мозга / С.А. Румянцева, Е.В. Силина. – М.: Медицинская книга, 2007. – 60 с.
9. Суслина, З.А. Цитофлавин – как средство профилактики поражений мозга в кардиохирургии / З.А. Суслина [и др.] // Профилакт. и клин. мед. – 2010. – №1. – С. 69–74.
10. Цыган, Н.В. Нейропротекция при реконструктивных операциях на дуге аорты / Н.В. Цыган [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2012. – №2. – С. 119–127.
11. Черешнев, В.А. Фармакологическое регулирование программированной гибели клеток / В.А. Черешнев [и др.]. – СПб.: Наука, 2011. – 255 с.
12. Шевченко, Ю.Л. Кардиогенный и ангиогенный церебральный инсульт (физиологические механизмы и клинические проявления) / Ю.Л. Шевченко [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2006. – 272 с.
13. Щербаков, А.М. Фактор роста эндотелия сосудов, его рецепторы и антиапоптотические белки BCL-2 и AKT при раке молочной железы / А.М. Щербаков [и др.] // Опухоли жен. репродукт. системы. – 2006. – №3. – С. 63–68.
14. Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев, М.В. Резванцев / 3-е изд., доп. – СПб.: ВМедА, 2011. – 318 с.
15. Aloe, L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use / L. Aloe [et al.] // J. transl. med. – 2012. – Vol. 10, № 239. – P. 1–15.
16. Bozoyan, L. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffoldin the postnatal brain via VEGF signaling / L. Bozoyan, J. Khlghatyan, A. Saghatelyan // J. neurosci. – 2012. – Vol. 32, № 5. – P. 1687–1704.
17. Butterworth, R.J. Serum neuron-specific enolase, carnosinase, and their ratio in acute stroke / R.J. Butterworth [et al.] // Stroke. – 1996. – Vol. 27. – P. 2064–2068.
18. Chodobski, A. Early neutrophilic expression of vascular endothelial growth factor after traumatic brain injury / A. Chodobski [et al.] // Neurosci. – 2003. – Vol. 122, № 4. – P. 853–867.
19. D'Ercole, A.J. Mutant mouse models of insulin-like growth factor

actions in the central nervous system / A.J. D'Ercole, P. Ye, J.R. O'Kusky // Neuropeptides. – 2002. – Vol. 36, № 2–3. – P. 209–220.

20. Daftary, S.S. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function / S.S. Daftary, A.C. Gore // Exp. biol. med. (Maywood). – 2005. – Vol. 230, № 5. – P. 292–306.
21. Duffy, K.R. Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor / K.R. Duffy, W.M. Pardridge, R.G. Rosenfeld // Metabolism. – 1988. – Vol. 37, № 2. – P. 136–140.
22. Emanueli, C. Paracrine control of vascularization and neurogenesis by neurotrophins / C. Emanueli [et al.] // Brit. j. pharmacol. – 2003. – Vol. 140, № 4. – P. 614–619.
23. Furukawa, S. Nerve growth factor synthesis and its regulatory mechanisms: an approach to therapeutic induction of nerve growth factor synthesis / S. Furukawa, Y. Furukawa // Cerebrovasc. brain metab. rev. – 1990. – Vol. 2, № 4. – P. 328–344.
24. Guan, J. Insulin-like growth factor-1 and post-ischemic brain injury / J. Guan [et al.] // Prog. neurobiol. – 2003. – Vol. 70, № 6. – P. 443–462.
25. Hai, J. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain / J. Hai [et al.] // Neurosurgery. – 2003. – Vol. 53, № 4. – P. 963–970.
26. Harrigan, M.R. Intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor promotes cerebral angiogenesis with minimal brain edema / M.R. Harrigan [et al.] // Neurosurgery. – 2002. – Vol. 50, № 3. – P. 589–598.
27. Khaibullina, A.A. Vascular endothelial growth factor promotes neurite maturation in primary CNS neuronal cultures / A.A. Khaibullina, J.M. Rosenstein, J.M. Krum // Brain res. dev. Brain res. – 2004. – Vol. 148, № 1. – P. 59–68.
28. Kwon, S.K.C. Stress and traumatic brain injury: a behavioral, proteomics, and histological study / S.K.C. Kwon [et al.] // Frontiers in neurol. – 2011. – Vol. 2, Art. 12. – P. 1–14.
29. Lafuente, J.V. Role of VEGF in an experimental model of cortical micronecrosis / J.V. Lafuente [et al.] // Amino acids. – 2002. – Vol. 23, № 1–3. – P. 241–245.
30. Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor thirty-five years later / R. Levi-Montalcini // In vitro cell. dev. biol. – 1987. – Vol. 23, № 4. – P. 227–238.
31. Lupien, S.B. Systemic insulin-like growth factor-I administration prevents cognitive impairment in diabetic rats, and brain IGF regulates learning/memory in normal adult rats / S.B. Lupien, E.J. Bluhm, D.N. Ishii // J. neurosci. res. – 2003. – Vol. 74, № 4. – P. 512–523.
32. Mackay, K.B. Neuroprotective effects of insulin-like growth factor-binding protein ligand inhibitors in vitro and in vivo / K.B. Mackay [et al.] // J. cereb. blood flow metab. – 2003. – Vol. 23, № 10. – P. 1160–1167.
33. Reichardt, L.F. Neurotrophic factors: A window into the nervous system / L.F. Reichardt // Neurobiology of the neurotrophins. – FP Graham Publishing, 2001. – P. 3–28.
34. Rosenstein, J.M. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons / J.M. Rosenstein [et al.] // J. neurosci. – 2003. – Vol. 23, № 35. – P. 11036–11044.
35. Shahsavand, S. Effect of Erythropoietin on Serum Brain-Derived Biomarkers after Carbon Monoxide Poisoning in Rats / S. Shahsavand [et al.] // Iran. j. basic med. sci. – 2012. – Vol. 15, № 2. – P. 752–758.
36. Svetlov, S.I. Neuro-glial and systemic mechanisms of pathological responses in rat models of primary blast overpressure compared to «composite» blast / S.I. Svetlov [et al.] // Frontiers in neurol. – 2012. – Vol. 3, Art. 15. – P. 1–12.
37. Wang, J. Insulin-like growth factor-1 secreted by brain microvascular endothelial cells attenuates neuron injury upon ischemia / J. Wang [et al.] // FEBS J. – 2013. – Vol. 280, N15. – P. 3658–3568.
38. Yamagishi, S. Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons / S. Yamagishi [et al.] // Brain res. mol. brain res. – 2003. – Vol. 119, № 2. – P. 184–191.
39. Yang, S.Z. Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains / S.Z. Yang [et al.] // Anat. rec. a. discov. mol. cell evol. biol. – 2003. – Vol. 274, № 1. – P. 851–856.
40. Zheng, W.H. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): A neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway / W.H. Zheng [et al.] // J. neural. transm. – 2000. – Vol. 60, suppl. – P. 261–272.

*N.V. Tsygan, A.P. Trashkov*

## Brain functional state and neurotrophic mechanisms of its protection in acute cerebral hypoxia

***Abstract.*** *The functional state of the brain and neurotrophic mechanisms of its protection in acute cerebral hypoxia were studied. The experiment involved 186 adult male rats. The rats in experimental groups underwent acute thromboembolism and following occlusion of the right carotid artery. The functional state of the brain and neurotrophic mechanisms activity had been analyzed in 75 untreated rats and 75 rats treated with complex cytoprotective drug cytoflavin over the 10 days following the acute hypoxia. A neurological examination was accomplished daily, the brain cytolysate levels of NSE, NGF, VEGF-A and serum levels of NSE, GFAP, S100 , VEGF-A, IGF-1 were measured on the 1st, 3rd, 10th day. The NSE brain cytolysate level in untreated animals went up on the 1st day and the NSE serum level was up on the 3rd day (significantly lower in treated animals), which indicated an acute and delayed alteration of neurons. Neuroglial biomarkers in untreated animals went up on the 1st (GFAP), 3rd and 10th (S100 ) day (significantly lower in treated animals), which indicated an acute and delayed alteration of glial cells. The levels of growth factors went up on the 3rd day (NGF in brain cytolysate) and 10th day (VEGF-A in brain cytolysate and serum, IGF-1 in serum) in both groups. Treated animals showed elevation of VEGF-A brain cytolysate level on the 1st, 3rd, 10th day. IGF-1 serum level was significantly higher on the 10th day in treated animals comparing with untreated animals. Thus acute cerebral hypoxia promoted acute and delayed alteration of neurons and glial cells, neurotrophic mechanisms activated predominantly with delay. The cytoflavin proved to have prolonged multimodal cytoprotective effect on neurons and glial cells, accompanied by activation of neurotrophic mechanisms from the 1st day after the acute cerebral hypoxia.*

***Key words*****:** *acute cerebral hypoxia, nerve tissue biomarkers, NSE, GFAP, S100 , nerve growth factors, NGF, VEGF-A, IGF-1, neurotrophic mechanisms, neuroprotection, cytoflavin, головной мозг.*

Контактный телефон: +7-921-928-94-70; e-mail: 77tn77@gmail.com