

УДК 616.831-001-085.356:577.164.186:57.081

## ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТОЯНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.В. Полещук<sup>1</sup>, К.А. Дроздов<sup>2</sup>, Н.А. Андреева<sup>1</sup>, Т.В. Балашова<sup>1</sup>, В.В. Попова<sup>1</sup><sup>1</sup> Владивостокский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии (690022, Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, α-липовая кислота, сосуды, оксид азота.

В эксперименте на 62 крысах с изолированной тяжелой черепно-мозговой травмой проанализирована терапевтическая эффективность альфа-липовой кислоты. Морфологическими и нейровизуализационными методами достоверно подтверждено уменьшение отека тканей головного мозга в зоне вторичного повреждения. Церебропротекторный эффект препарата, по мнению авторов, реализуется через нитроксидпродуцирующую функцию микрососудов мозга.

Многие патофизиологические механизмы вторичного повреждения мозга рассматриваются большинством авторов как потенциально обратимые, а их выявление и устранение считаются основной мишенью фармакологического действия препаратов, применяемых у пациентов с черепно-мозговой травмой (ЧМТ). Современная концепция комплексной нейрональной защиты предполагает ослабление окислительного стресса и улучшение энергетического метаболизма нейронов [3].

Как известно, α-липовая кислота способна инактивировать повреждающие радикалы и оксиданты и ингибировать их образование, поддерживать естественный антиоксидантный статус и восстанавливать мембрану нервной клетки и ее энергетический метаболизм. Кроме того, в ряде исследований была показана способность α-липовой кислоты снижать активность индуцибельной и усиливать экспрессию эндотелиальной нитроксидсинтазы. Механизмы вазо- и органопротекторного действия α-липовой кислоты подтверждены *in vitro* и в экспериментах на животных при хронических, длительно развивающихся дисфункциях [7, 11, 14].

Препараты α-липовой кислоты широко используются при лечении диабетической и алкогольной полинейропатий, а также ишемических инсультов [2]. Однако вопросы, связанные с влиянием данного препарата на состояние микроциркуляторного русла и целесообразностью его включения в терапию в острого периода ЧМТ для предупреждения ишемических и реперфузионных повреждений, изучены недостаточно.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 62 белых беспородных крысах-самцах, травмированных в области средней трети правой височно-теменной доли по методу Соколовой-Редькина [6] и разделенных на 2 группы. 1-я группа – 27 животных с ЧМТ; 2-я

группа – 27 животных с ЧМТ, которым внутривенно вводили α-липовую кислоту 1 раз в сутки в дозе 10 мг/кг в течение 7 суток. Еще 8 животных (без ЧМТ) использованы в качестве контроля нормы.

Проводился комплекс морфологических и гистохимических исследований перифокальной зоны. Выявлялись прижизненные изменения на магнитно-резонансном томографе PharmaScan US 70/16 фирмы Bruker (объем поражения мозга рассчитывали по методике Д.Н. Силачева и А.А. Учеваткина [5]). После выведения животных из опыта препараты мозга окрашивали гематоксилином и эозином, а также толуидиновым синим по Нисслю; проводилась интравазальная инъекция туши и расчет параметров микроциркуляторного русла по методике Блинкова-Моисеева [1], по методике по V.T. Норе. и S.R. Vincent [10] выявляли NADPH-диафорузу. В сыворотке крови определяли уровень метаболитов оксида азота.

Все исследования проводились с разрешения этического комитета согласно приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Полученные данные обработаны с помощью программы Statistika 6.0 с использованием критериев Фишера и Стьюдента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (ГК 02.740.11.0450).

**Результаты исследования.** При магнитно-резонансной томографии было зафиксировано синхронное и практически равнозначное нарастание объема отека в перифокальной зоне у животных обеих групп, достигавшее максимума через 24 часа (рис. 1). В дальнейшем, начиная с 72 часов, во 2-й группе отмечалась достоверная динамика снижения объема перифокального отека (рис.).

На всех сроках исследования на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и по Нисслю, во 2-й группе отмечались менее выраженные признаки отека и ишемии нервной ткани (21 и 34% через 24 часа, 41 и 65% через 72 часа, 60 и 97% через 7 суток в 1-й и 2-й группах соответственно).

При морфометрическом исследовании спустя 24 часа после травмы в перифокальной зоне мозга крыс 2-й группы регистрировались признаки компенсаторной реакции в виде увеличения длины открытых

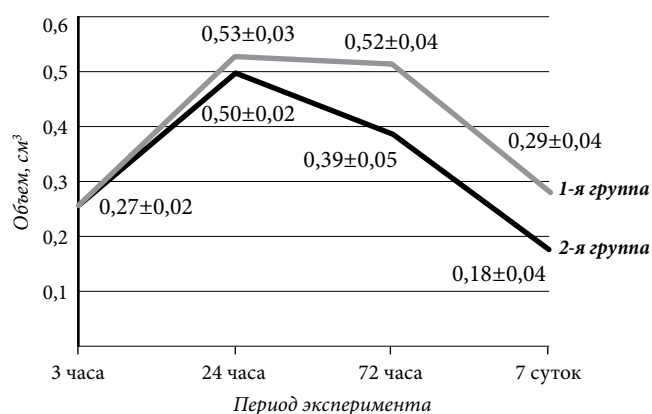


Рис. Динамика перифокального отека головного мозга у лабораторных крыс с индуцированной ЧМТ, по данным магнитно-резонансной томографии.

капилляров на 45%. В результате на 45% возрастала площадь обменной поверхности. В мозге животных 1-й группы, наоборот, отмечалось снижение всех измеряемых параметров (на 39% – длина, на 36% – диаметр и на 60% – площадь). В интактном полушарии происходили синхронные изменения, свидетельствовавшие о том, что в патологический процесс вовлекался весь мозг (табл. 1).

На гистохимических препаратах в обеих группах отмечалось увеличение количества открытых NADPH-позитивных капилляров и площади их обменной поверхности, более выраженное во 2-й группе (на 37% по отношению к контрольным значениям). При этом их диаметр достоверно не изменялся в обеих группах (табл. 1). Активность диафоразы значительно

увеличивалась по отношению к контролю в обеих группах (табл. 2). Содержание метаболитов оксида азота в сыворотке крови у крыс 2-й группы не изменялось, а в 1-й группе отмечалось достоверное падение этих значений (табл. 3).

Через 72 часа на препаратах, инъецированных тушью у животных, получавших липоевую кислоту, отмечались умеренно повышенные диаметр и плотность капилляров (табл. 1). При этом площадь гематотканевого обмена оставалась выше нормы на 17%. У животных, не получавших фармакологической поддержки, сохранялся узкий просвет капилляров (на 35% ниже контрольных значений). И, несмотря на увеличение длины капиллярного русла, снижалась площадь обменной поверхности, что подтверждают данные МРТ-диагностики. На гистохимических препаратах у животных обеих групп площадь обменной поверхности увеличилась за счет плотности (табл. 1). При этом во 2-й группе диаметр капилляров не отличался от контрольных значений, а у крыс 1-й группы был снижен. Активность NADPH-диафоразы во 2-й группе животных сохранялась на высоком уровне, а в 1-й группе снижалась, оставаясь тем не менее выше контрольных значений (табл. 2). Содержание нитритов в крови крыс 2-й группы существенно увеличилось, а у крыс 1-й группы приближалось к норме (табл. 3).

К 7-м суткам у всех животных диаметр инъецированных тушью капилляров был достоверно увеличен по отношению к контролю (табл. 1). При этом плотность и площадь их обменной поверхности приближались к норме. На гистохимических препаратах площадь

Таблица 1

Параметры капиллярного русла головного мозга у крыс с ЧМТ

Параметр	Период	Контроль	2-я группа		1-я группа		
			травмированное полушарие	интактное полушарие	травмированное полушарие	интактное полушарие	
Капилляры, инъецированные тушью	Плотность, мм/мм <sup>3</sup>	24 часа	623±39	902±37 <sup>1, 3</sup>	1238±57 <sup>1, 3</sup>	380±21 <sup>1</sup>	847±54 <sup>1</sup>
		72 часа	623±39	669±38 <sup>2, 3</sup>	629±29 <sup>2, 3</sup>	796±32 <sup>1, 2</sup>	778±53 <sup>1</sup>
		7 суток	623±39	597±17	616±23 <sup>3</sup>	552±41 <sup>2</sup>	455±27 <sup>1, 2</sup>
	Диаметр, мкм	24 часа	5,33±0,13	5,34±0,21 <sup>3</sup>	5,33±0,15 <sup>3</sup>	3,44±0,23 <sup>1</sup>	3,80±0,12 <sup>1</sup>
		72 часа	5,33±0,13	5,79±0,23 <sup>3</sup>	5,88±0,21 <sup>3</sup>	4,00±0,20 <sup>1</sup>	3,99±0,14 <sup>1</sup>
		7 суток	5,33±0,13	5,91±0,17 <sup>1</sup>	5,82±0,15 <sup>1</sup>	5,87±0,12 <sup>1, 2</sup>	6,10±0,14 <sup>1, 2</sup>
	Площадь обменной поверхности, мм <sup>2</sup>	24 часа	10427±557	15124±238 <sup>1, 3</sup>	20719±346 <sup>1, 3</sup>	4148±244 <sup>1</sup>	10106±652
		72 часа	10427±557	12163±143 <sup>1, 2, 3</sup>	11613±288 <sup>2, 3</sup>	9998±423 <sup>2</sup>	9747±354
		7 суток	10427±557	11078±164 <sup>2</sup>	11257±245 <sup>3</sup>	10174±562	8715±577 <sup>1</sup>
NADPH-d-позитивные капилляры	Плотность, мм/мм <sup>3</sup>	24 часа	209±14	284±26 <sup>1</sup>	320±22 <sup>1, 3</sup>	262±18 <sup>1</sup>	242±23
		72 часа	209±14	268±22 <sup>1, 2</sup>	279±16 <sup>1, 2, 3</sup>	314±22 <sup>1, 2</sup>	353±23 <sup>1</sup>
		7 суток	209±14	280±17 <sup>1</sup>	283±23 <sup>1</sup>	270±15 <sup>1, 2</sup>	258±27 <sup>2</sup>
	Диаметр, мкм	24 часа	6,10±0,13	6,15±0,11	6,20±0,15	5,80±0,17	6,20±0,21
		72 часа	6,10±0,13	6,22±0,17 <sup>3</sup>	6,33±0,14 <sup>3</sup>	5,15±0,17 <sup>1, 2</sup>	5,50±0,20 <sup>1, 2</sup>
		7 суток	6,10±0,13	6,13±0,14	6,20±0,14	6,00±0,09 <sup>2</sup>	6,50±0,08 <sup>1, 2</sup>
	Площадь обменной поверхности, мм <sup>2</sup>	24 часа	4003±156	5484±220 <sup>1</sup>	6229±177 <sup>1, 3</sup>	4771±454	4711±452
		72 часа	4003±156	5238±122 <sup>1</sup>	5545±110 <sup>1, 2</sup>	5077±458 <sup>1</sup>	6096±316 <sup>1, 2</sup>
		7 суток	4003±156	5390±164 <sup>1</sup>	5509±277 <sup>1</sup>	5087±114 <sup>1</sup>	5266±321 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Разница по сравнению с контролем статистически значима.

<sup>2</sup> Разница с предыдущим периодом статистически значима.

<sup>3</sup> Разница с аналогичным полушарием у животных 1-й группы статистически значима.

**Таблица 2**  
Активность NADPH-диафоразы в стенке сосудов микроциркуляторного русла головного мозга у крыс с ЧМТ

Период	Активность NADPH-диафоразы, ЕОП				
	Контроль	2-я группа		1-я группа	
		травмированное полушарие	интактное полушарие	травмированное полушарие	интактное полушарие
24 часа	7,31±0,58	12,00±0,33 <sup>1</sup>	13,20±0,38 <sup>1</sup>	10,70±0,79 <sup>1</sup>	9,30±0,81 <sup>1</sup>
72 часа	7,31±0,58	12,80±0,39 <sup>1</sup>	13,00±0,40 <sup>1</sup>	8,63±0,67 <sup>1,2</sup>	8,80±0,73 <sup>1</sup>
7 суток	7,31±0,58	10,50±0,53 <sup>1,2</sup>	10,00±0,58 <sup>1,2</sup>	6,98±0,42 <sup>2</sup>	7,20±0,54 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Разница с контролем статистически значима.

<sup>2</sup> Разница с предыдущим периодом статистически значима.

**Таблица 3**  
Содержание нитритов в крови экспериментальных животных с ЧМТ

Период	Содержание нитритов, нмоль/л		
	Контроль	2-я группа	1-я группа
24 часа	13,3±3,9	13,1±0,6 <sup>1</sup>	6,2±0,7 <sup>1</sup>
72 часа	13,3±3,9	18,6±0,8 <sup>1,2</sup>	11,8±1,3 <sup>2</sup>
7 суток	13,3±3,9	14,3±1,3 <sup>2</sup>	9,8±1,1

<sup>1</sup> Разница с контролем статистически значима.

<sup>2</sup> Разница с предыдущим периодом статистически значима.

обменной поверхности в обеих группах значительно превышала контрольные значения за счет увеличенной плотности при неизменном диаметре (табл. 1). При этом активность фермента во 2-й группе несколько снижалась, но оставалась выше контрольных значений в 1,5 раза, а в 1-й группе, не получавшей фармакологической поддержки, снижалась до уровня контроля (табл. 2). Содержание нитритов в крови животных обеих групп находилось в пределах референсных значений контроля (табл. 3).

**Обсуждение полученных данных.** Известно, что выраженность отека нервной ткани и степень гидратации головного мозга при ЧМТ являются одними из решающих факторов, определяющих исход заболевания [9]. Отсутствие значимого терапевтического эффекта α-липоевой кислоты в первые сутки можно объяснить малым промежутком времени с момента первого введения, недостаточным для полной реализации фармакологической активности препарата. Однако в дальнейшем у животных, получавших α-липоевую кислоту, отмечалась более выраженная динамика снижения объема перитравматического отека. Данный эффект может быть связан в первую очередь с антирадикальным действием α-липоевой кислоты, апробированным на экспериментальных моделях [7, 13]. В свою очередь мы предполагаем, что церебропротекторное действие липоевой кислоты в условиях острого травматического повреждения может быть реализовано за счет изменения активности системы синтеза оксида азота и опосредованной нитроксидзависимой модуляции сосудистого тонуса.

Через 24 часа после травмы в перифокальной зоне мозга крыс 1-й группы на фоне общего ухудшения

параметров микроциркуляции в травмированном полушарии нитроксидергические сосуды мозга демонстрировали признаки компенсаторного восстановления. Полученные данные согласуются с результатами исследований К.П. Иванова и Н.Н. Мельникова [4], показавших замедление циркуляции крови в сосудах, расположенных около очага. Не исключено, что данный дисбаланс в первые сутки после травматического повреждения усугубляется экспрессией индуцибельной нитроксидсинтазы в клетках эндотелия, а также глиальных и нервных клетках поврежденного участка мозга и обуславливает развитие цитотоксических поражений нервной ткани в зоне пенумбры [8].

О динамике вазорегуляторных механизмов головного мозга после ЧМТ можно судить, оценивая состояние капиллярного русла через 72 часа и через 7 суток. Одной из важнейших причин вторичного повреждения головного мозга может быть реперфузия капилляров, приводящая к выбросу токсических продуктов распада ткани, нарастанию зоны некроза и формированию отсроченных геморрагий. С другой стороны, длительное поддержание состояния гипоперфузии в поврежденной ткани может привести к более глубоким и необратимым дисметаболическим и дисциркуляторным расстройствам. Таким образом, сохранение оптимального баланса циркуляции крови и вазомоторного тонуса микроциркуляторного звена в нервной ткани может снижать вероятность и глубину вторичных патологических процессов [3].

По нашим данным, уровень экспрессии NADPH-диафоразы в микрососудах мозга к 72 часам после травмы в сосудах мозга животных, не получающих фармакологическую поддержку, снижался. На этом фоне как на препаратах, окрашенных тушью, так и на гистохимических препаратах отмечались признаки гипоперфузии поврежденной ткани мозга, сохранявшиеся у животных 1-й группы вплоть до конца эксперимента.

Использование α-липоевой кислоты меняет морфологическую и нейрохимическую ситуацию в микроциркуляторном звене поврежденного полушария. В мозге животных 2-й группы на протяжении 3 суток после травмы регистрировались морфологические и биохимические признаки восстановления микроциркуляции. Это проявляется как на инъецированных тушью препаратах, так и на нитроксидергических элементах микроциркуляторного русла. Улучшение морфологического состояния нервной ткани в данной группе (зафиксированное нами при томографическом исследовании, а также на гистологических препаратах) может объясняться более эффективной реализацией вазомоторных эффектов нитроксида, экспрессия которого резко возрастает к 72 часам при тканевой травме у животных, получавших α-липоевую кислоту. В этот период реализуются и другие хорошо известные

к настоящему времени фармакологические эффекты этого препарата – антирадикальный и противовоспалительный. В отношении последнего следует обратить внимание на то, что цитопротективное действие  $\alpha$ -липоевой кислоты отчасти связано с угнетением синтеза индуцибельной NO-синтазы и последующего ингибирования провоспалительных тканевых реакций. Данный эффект был зарегистрирован на культуре клеток печени и на культуре нейроглиальных клеток [12, 15].

Установлено, что в условиях хронического дефицита синтеза оксида азота в сосудах или при развитии тканевой гипоксии препарат оказывает действие за счет стимуляции двух механизмов – активирует биосинтез оксида азота эндотелиальными клетками путем фосфорилирования эндотелиальной нитроксидсинтазы и увеличивает его биодоступность [11]. В нашем исследовании впервые на модели острого повреждения головного мозга был зарегистрирован данный механизм действия препарата. Не исключено, что сохранение диаметра капилляров, связанное с возрастанием NADPH-диафоразной активности в острый период травматической болезни, направлено на компенсацию дефицита кислорода и борьбу с гипоксией.

Зафиксированные морфологическими методами изменения нитроксидергической активности капилляров подтверждаются в нашей работе данными о системных эффектах препарата, полученными при анализе содержания метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Снижение уровней метаболитов в 1-й группе предположительно свидетельствует о снижении генерации оксида азота эндотелиальной нитроксидсинтазой, в то время как во 2-й группе эндотелиальная функция сохранялась в течение всего периода наблюдения.

Также было выявлено, что изменения микроциркуляторного русла при тяжелой ЧМТ проявляются не только в пределах участка травматического, но распространяются и на контрлатеральное полушарие. Зарегистрированное синхронное, или почти синхронное, течение процесса в обоих полушариях свидетельствует о том, что в патологический процесс вовлекается весь мозг в целом за счет включения согласующих и пока не очень хорошо известных механизмов.

По нашему мнению, одним из механизмов фармакологической активности  $\alpha$ -липоевой кислоты наряду с ее высоким антирадикальным и противовоспалительным потенциалом является способность регулировать процессы локальной гемодинамики за счет влияния на систему синтеза оксида азота. Нитроксидмодулирующее действие препарата развивается достаточно быстро и реализуется в течение первых 3 суток его применения, что позволяет рассматривать  $\alpha$ -липоевую кислоту в качестве эффективного компонента экстренной терапии при травмах центральной нервной системы.

#### Литература

1. Блинков С.М., Моисеев Г.Д. Определение плотности капиллярной сети в органах и тканях человека и животных

независимо от толщины микротомного среза // Доклады АН СССР. 1961. Т. 140, № 2. С. 465–468.

2. Бустаманте Дж., Лодж Дж., Маркоччи Л. и др. Метаболизм  $\alpha$ -липоевой кислоты в печени при различных формах патологии // Международный медицинский журнал. 2001. № 2. С. 133–142.
3. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Платонова И.А. Терапия ишемического инсульта // *Consilium medicum*. 2003. № 5. С. 18–25.
4. Иванов К.П., Мельникова Н.Н. Морфодинамический анализ роли лейкоцитов в нарушении микроциркуляции в коре мозга // *Морфология*. 2003. Т. 124, № 6. С. 61–65.
5. Силачев Д.Н., Учеваткин А.А., Пирогов Ю.А. и др. Сравнение магнитно-резонансной томографии и трифенилтетразолиевого выявления повреждений головного мозга как методов исследования экспериментальной фокальной ишемии // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2009. Т. 147, № 2. С. 232–237.
6. Соколова Т.Ф., Редькин Ю.В. Способ моделирования дозированной закрытой черепно-мозговой травмы у белых крыс // *Вопросы нейрохирургии*. 1986. № 2. С. 68–69.
7. Emmez H., Yildirim Z., Kale A. et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of alpha-lipoic acid on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits // *Acta Neurochir*. 2010. Vol. 152. P. 1591–1601.
8. Gahn C., Holmin S., Mathiesen T. Nitric oxide synthase expression after human brain contusion // *Neurosurgery*. 2002. Vol. 50. P. 1319–1326.
9. Ghajar J. Traumatic brain injury // *Lancet*. 2000. Vol. 356. P. 923–929.
10. Hope, B.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *J. Histochem. Cytochem*. 1989. Vol. 37. P. 653–661.
11. Hurdag C., Ozkara H., Citci S. et al. The effects of alpha-lipoic acid on nitric oxide synthetase dispersion in penile function in streptozotocin-induced diabetic rats // *Int. J. Tissue React*. 2005. Vol. 27. No. 3. P. 145–150.
12. Kierner A.K., Müller C.H., Vollmar A.M. Inhibition of LPS-induced nitric oxide and TNF- $\alpha$  production by  $\alpha$ -lipoic acid in rat Kupffer cells and in RAW 264.7 murine macrophages // *Immunol. Cell Biol*. 2002. Vol. 80. P. 550–557.
13. Tas N., Bakar B., Kasimcan M.O. et al. Evaluation of protective effects of the alpha lipoic acid after spinal cord injury: An animal study // *Injury*. 2010. Vol. 41. P. 1068–1074.
14. Toklu H.Z., Hakan T., Celik H. et al. Neuroprotective Effects of Alpha-Lipoic Acid in Experimental Spinal Cord Injury in Rats // *J. Spinal. Cord. Med*. 2010. Vol. 33, No. 4. P. 401–409.
15. Wong A., Dukic-Stefanovic S., Gasic-Milenkovic J. et al. Anti-inflammatory antioxidants attenuate the expression of inducible nitric oxide synthase mediated by advanced glycation endproducts in murine microglia // *Eur. J. Neurosci*. 2001. Vol. 14. P. 1961–1967.

Поступила в редакцию 20.03.2012.

#### EFFECTS OF ALPHA LIPOIC ACID ON THE STATE OF CEREBRAL MICROCIRCULATORY BLOODSTREAM IN CASE OF EXPERIMENTAL CRANIOCEREBRAL TRAUMA IN LABORATORY ANIMALS

A.V. Poleschuk<sup>1</sup>, K.A. Drozdov<sup>2</sup>, N.A. Andreeva<sup>1</sup>, T.V. Balashova<sup>1</sup>, V.V. Popova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), <sup>2</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (159 100th Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – The experiment conducted on 62 laboratory rats with isolated severe traumatic brain injuries allowed to analyze the therapeutic efficiency of Alpha lipoic acid. The morphologic and neurovisual methods of investigation confirmed reduction in the cerebral tissue edema in the area where the secondary injury occurred. The authors believe the brain protective effects of the drug resulted from the nitric oxide-producing function of the brain microvessels.

**Key words:** craniocerebral trauma, Alpha lipoic acid, vessels, nitric oxide.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 4, p. 25–28.