

**Т.М. Коваленко, І.О. Осадченко, О.М. Цупиков,
Т.А. Півнева, А.С. Шаламай, О.О. Мойбенко, Г.Г. Скибо**

Нейропротекторний ефект кверцетину при експериментальній ішемії мозку

Изучали нейропротекторное действие водорастворимого препарата кверцетина при ишемическом повреждении мозга. Путем двухстороннего пережатия сонных артерий у песчанок моделировалась острая ишемия гиппокампа. Критерием повреждающего действия ишемии служило состояние нейронов зоны СА1 гиппокампа и реакция глиальных клеток на 7-е сутки после ишемии-реперфузии. Используя систему анализа изображений проводили морфометрическую обработку изменений клеточного состава изучаемой области. При использовании кверцетина увеличивалось количество выживших нейронов и уменьшался реактивный астроглиоз после ишемии-реперфузии, что позволяет использовать данный препарат для фармакологической коррекции церебро-вазкулярных нарушений.

ВСТУП

Гострі порушення мозкового кровотоку несуть загрозу виникнення незворотних структурних ушкоджень нервової тканини та ризику розвитку з часом нейродегенеративних захворювань головного мозку. Серед основних причин, які запускають механізми ішемічного пошкодження нервової тканини розглядають наступні: 1) накопичення збуджувальних нейромедіаторних амінокислот у позаклітинному просторі, котрі діють цитотоксично на структури мозку; 2) індукція вільнорадикальних процесів, які активують перекисне окиснення ліпідів і викликають оксидативне ушкодження мембран, протеїнів і ДНК [7, 9, 15, 25]; 3) перевантаження клітин кальцієм, що призводить до виникнення низки послідовних цитоплазматичних подій, котрі викликають пошкодження тканини через активацію протеаз і фосфоліпаз. Відновлення кровотоку в мозку після ішемії також спричинює ушкодження нервової тканини, пов'язані з реперфузією та реоксигенацією, які також роблять свій внесок в активацію процесів

вільнорадикального окиснення [8, 16].

Більше десяти років тому було відкрито феномен відстроченої загибелі нейронів, суть якого полягає в тому, що незворотні зміни в нейронах настають не одразу після ішемічного ушкодження, а через деякий час (години, доби), тривалість якого залежить від інтенсивності цього ушкодження [10, 13, 21]. Явище відстроченої загибелі нейронів свідчить про те, що існує певний проміжок часу після ішемічного впливу, протягом якого можлива фармакологічна корекція уражених нейронів і повернення їх до нормального стану.

Відомо, що нейрони в центральній нервовій системі надзвичайно чутливі до оксидативного стресу внаслідок багатьох факторів, включаючи високий вміст поліненасичених жирних кислот, іонів металів, недостатній захист антиоксидантними ферментами. Багатьма дослідженнями було показано, що вільні радикали безпосередньо залучені в механізми пошкоджень нейронів і відстроченої нейрональної смерті, викликані ішемією-реперфузією [1, 7, 18].

© Т.М.Коваленко, І.О.Осадченко, О.М.Цупиков, Т.А.Півнева, А.С.Шаламай, О.О.Мойбенко, Г.Г.Скибо

Встановлено, що безпосередню участь у контролі гомеостазу мозку та процесів регенерації нейронів беруть гліальні клітини-астроцити, які також відіграють значну роль у зміні морфологічної пластичності гіпокампа після ішемічного пошкодження [22].

Нині проводиться постійний пошук нейропротекторних засобів, які впливають на механізми ішемічно-реперфузійних ушкоджень мозку, котрі необхідно застосовувати в найперші години та доби після ішемічного удару; особлива увага приділяється інгібіторам вільнорадикальної активації [26].

Відомо, що біофлавоноїд кверцетин є одним з найпотужніших антиоксидантів не тільки серед флавоноїдів, а і серед сполук інших фармакологічних груп, переважаючи за цими властивостями α -токоферол. Він виступає як модулятор активності різних ферментів, що беруть участь у деградації фосфоліпідів, впливають на вільнорадикальні процеси та відповідають за клітинний біосинтез оксиду азоту, протейназ тощо. Кверцетин проявляє також антирадикальну, мембраностабілізуючу дію [2, 11, 19, 23]. Застосування численних корисних фармакологічних властивостей кверцетину й інших біофлавоноїдів протягом довгого часу було обмежене низькою біодоступністю існуючих лікарських форм внаслідок поганої розчинності їх у воді і в біологічних рідинах організму. Тому українськими дослідниками, клініцистами та фармакологами [3–6] було створено перший у світі водорозчинний інгібітор ліпоксигенази, придатний для внутрішньовенного введення хворим людям – водорозчинний кверцетин (ВК). Цей препарат має сильну антиоксидантну дію і, крім того, унікальні властивості в плані активації ендотеліальної NO-синтази та збільшення продукції оксиду азоту. Під час експериментальних досліджень специфічної дії ВК на моделі ішемії-реперфузії міокарда було виявлено пригнічення продукції ненасичених жирних кислот, зокрема арахідонової кислоти та її метаболітів (пептидлейкотри-

енів), гальмування активності нейтрофілів і значне зменшення некротичного ураження міокарда [3, 4]. У клінічних дослідженнях [5, 6] доведена висока ефективність ВК як кардіопротекторного препарату при гострому інфаркті міокарда.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив ВК на виживання нейронів зони СА1 гіпокампа та реакції астроглії при короткотривалій ішемії мозку. Як об'єкт досліджень, нами був обраний гіпокамп – структура мозку, відповідальна за процеси формування пам'яті та навчання, нейрони якого, особливо в зоні СА1, є надзвичайно чутливими до нестачі кисню порівняно з іншими структурами мозку [17, 24]. Окрім того, популяція нервових клітин у гіпокампі завдяки специфічному місцезонашуванню є найбільш придатною системою для кількісної оцінки структурних змін при ішемії мозку [14].

МЕТОДИКА

Для моделювання гострої глобальної ішемії мозку було використано 48 статевозрілих самців піщанки монгольської (*Meriones unguiculatus*) масою 70–90 г, оскільки у будові кровоносної системи головного мозку саме цих тварин є специфічні особливості, а саме недорозвинуте Вілізієве коло. Завдяки цьому даний вид тварин широко застосовують у світових наукових дослідженнях для створення моделі ішемії мозку за допомогою перетискання обох загальних сонних артерій [12]. Тварини були поділені на 4 групи. Псевдооперовані тварини склали I контрольну групу; їм проводили оперативне втручання, як при створенні ішемії, без перетискання сонних артерій. До II групи були віднесені тварини з модельованою ішемією. Тваринам цих груп вводили фізіологічний розчин за схемою введення ВК. Тваринам III групи також моделювали ішемію, після чого вводили ВК. До IV ввійшли тварини з ішемією, яким проводили

профілактичне введення разової дози препарату ВК за 2 год до ішемії і далі за схемою.

Схема введення: препарат вводили інтраперитонеально у разовій дозі 50 мг/кг маси (у перерахунку 5 мг/кг кверцетину; це доза, яка виявляє кардіопротекторну дію [3]). На 1-шу добу експерименту: перше введення відразу через 3–5 хв після ішемії, друге введення – через 2 год, третє введення – через 4 год; на 2-гу добу – двічі на добу через 12 год; на 3–6-ту добу – одноразове введення у вищевказаній дозі.

Тварин попередньо наркотизували внутрішньом'язовим введенням каліпсолю (75 мг/кг) і ксилазину (2 мг/кг), робили поперечний розтин шкіри на шиї та тупе розшарування підшкірно-жирової тканини та м'язів з наступним відпрепаруванням обох загальних сонних артерій. Під обидві судини підводили шовкові лігатури. Ішемію головного мозку викликали перетисканням (оклюзією) обох загальних сонних артерій за допомогою атравматичних мікрозатискачів протягом 7 хв із наступним їх зняттям і відновленням кровотоку (реперфузія). Післяопераційний дефект обробляли порошком стрептоциду, зашивали поліамідним шовним матеріалом і обробляли шкіру 5%-м спиртовим розчином йоду.

Оцінку нейропротекторної дії препарату проводили через 7 діб після ішемії. Для взяття матеріалу для гістологічних досліджень тварин анестезували ефіром і проводили фіксацію методом транскардіальної перфузії 4%-м розчином параформальдегіду та 2,5%-м розчином глютаральдегіду на 0,1 моль/л фосфатному буфері (рН 7,4). Виділений гіпокамп розрізали на поперечні зрізи товщиною близько 400 мкм і дофіксували у цьому самому розчині 1,5 год, а потім у 1%-му OsO_4 протягом 1 год. Тканину заливали в епоксидні смоли (Epon – Araldit) за загальноприйнятою методикою. Напівтонкі зрізи товщиною близько 1 мкм, забарвлені толуїдиновим синім і крезилвіолетом, вивчали на світлооптичному рівні та

проводили морфометричний аналіз одержаних препаратів за допомогою комп'ютерної системи аналізу зображень Image Tool і BIOQUANT (“R&M Biometrics”, США). Підраховували відносну кількість нейронів, які вижили (були неушкодженими) в зоні CA1 гіпокампа на 1 мм довжини пірамідального шару [14] після ішемії та після ішемії із застосуванням кверцетину порівняно з контролем.

Для виявлення реакції астроглії на дію ВК використовували імуногістохімічний метод забарвлення з застосуванням антитіл до гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ), який є специфічним маркером астроцитів. Частину фіксованої тканини гіпокампа заключали в парафін, потім депарафіновані зрізи мітили поліклональними кролячими антитілами, що специфічні до ГФКБ (1:500; “ДАКО”, Данія). Вплив ендогенної пероксидази блокували 0,3%-м розчином перекису водню. Зрізи інкубували в розчині первинних антитіл при 4°C протягом 20 і 12 год із вторинними кролячими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрину. Для візуалізації імуногістохімічного забарвлення використовували розчин діамінобензидину з додаванням 0,03%-го перекису водню. Після забарвлення зрізи дегідратували та заливали полістиролом (“Permount”, США). Для кількісної оцінки реакції астроглії використовували індекс щільності – сумарна кількість мічених клітин, яка була порахована в кожному шарі середньої частини зони CA1 на 100 мкм² площини зрізу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У гіпокампі контрольних тварин пірамідальні нейрони в зоні CA1 розташовувались у вигляді довгого шару шириною в 3–5 клітин. Тіла їх мали велике світле округле ядро з добре розрізняваними одним чи двома ядрцями та вузьку смужку дещо темнішої цитоплазми навколо ядра. Крім

того, на поперечних зрізах гіпокампа було видно чітко окреслені апікальні дендрити у поздовжньому розрізі, орієнтовані паралельно у радіальному напрямку (рис.1,а).

При вивченні препаратів гіпокампа експериментальних тварин були вироблені критерії оцінки ступеня ушкодження нейронів. Клітини, які світлооптично виглядали гіперхромними, з погано розрізняваними ядрами, зменшеними розмірами тіла, розглядали як загиблі, а нейрони, які мали просвітлену набряклу цитоплазму та світле набрякле ядро – як змінені або ушкоджені. Частина нейронів займала проміжне положення – у них збільшувалася здатність за-

барвлюватися толуїдиновим синім і крезил-віолетом у порівнянні з клітинами контрольних тварин, але контури ядер чітко виявлялись. Їх також відносили до ушкоджених клітин. Підраховували лише кількість неушкоджених клітин.

У групі тварин з ішемією на 7-му добу на перший план виходили некротичні зміни, які супроводжувались зморщуванням нейронів (див. рис. 1,б). Гіперхромні зморщені тіла нейронів були оточені пустотами, спостерігалось розрідження в пірамідальному шарі гіпокампа та зменшення його ширини внаслідок дегенерації частини нейронів разом з апікальними дендритами.

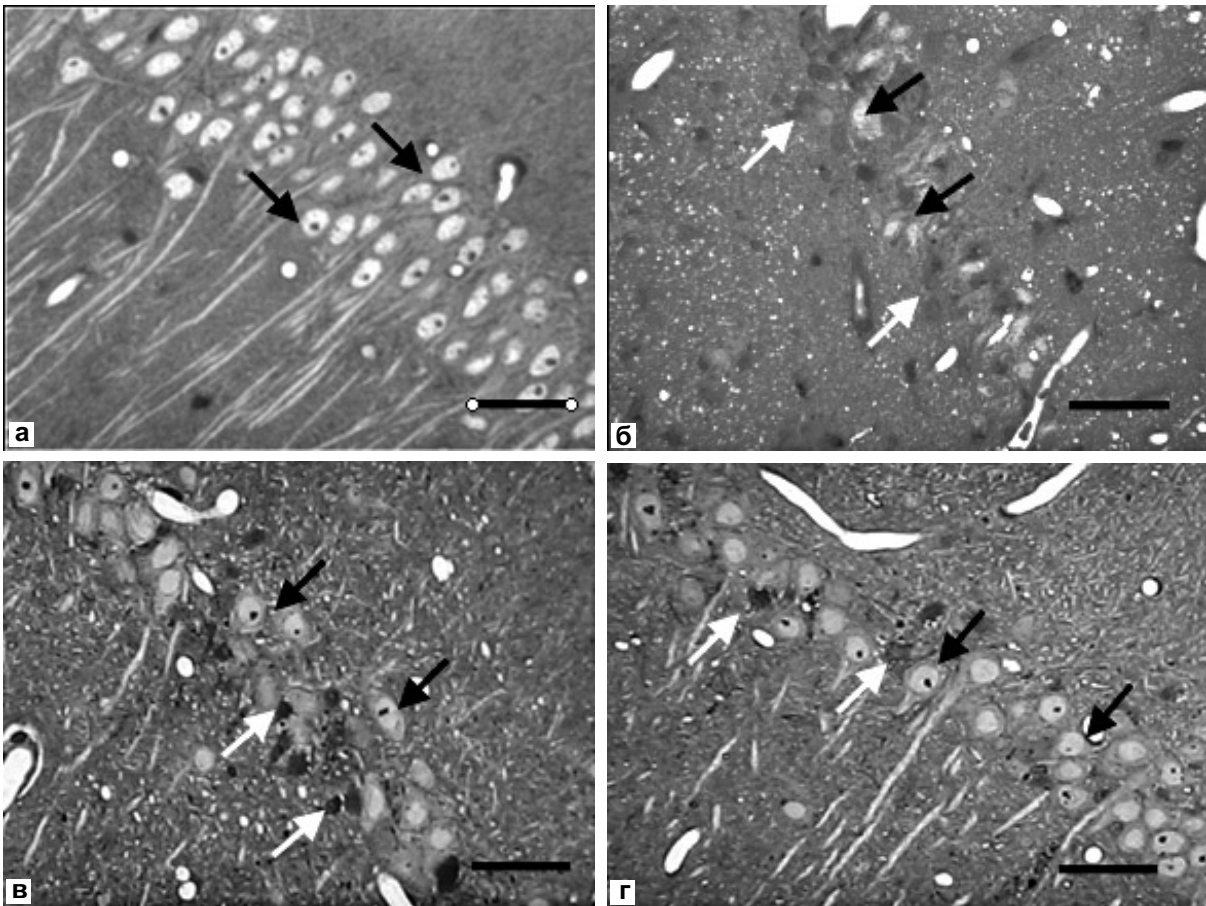


Рис. 1. Фрагменти зони СА1 гіпокампа у щанок: а – контроль, б – ішемія, в – введення кверцетину після ішемії, г – введення кверцетину до та після ішемії. Темні стрілки вказують на непошкоджені тіла нейронів, білі – на загиблі клітини. Шкала – 50 мкм.

Напівтонкі зрізи, забарвлення толуїдиновим синім і крезилвіолетом

Серед пошкоджених клітин зустрічалися також апоптотичні зміни нейронів у вигляді фрагментації їх ядер з утворенням апоптотичних тілець. Нейропіль мав губчастий вигляд, в його структурах можна було бачити світлі вакуолі та темні гранули. Лише незначна частина клітин у зоні СА1 гіпокампа ішемізованих тварин виглядала неушкодженою, тобто ці клітини мали добре вирізняване ядро, цитоплазму, хоча виглядали вони дещо набряклими.

Популяція нервових клітин у гіпокампі має специфічне місцезростаювання – тіла нейронів у зоні СА1 зосереджені у вигляді довгої вузької смужки в пірамідальному шарі, тому це дає можливість підраховувати їх кількість нейронів на одиницю довжини пірамідального шару за допомогою комп'ютерної системи аналізу зображень. На 7-му добу після ішемії кількість нейронів, які були непошкодженими в ішемізованих тварин була 20 ± 6 клітин на 1 мм довжини зони СА1 гіпокампа, що становило 9,8 % від кількості нейронів у тій самій зоні контрольних тварин (рис. 2).

Кількісна оцінка ураження СА1 зони у тварин експериментальних груп, яким вводили ВК протягом 6 дб у дозі 50 мг/кг маси інтраперитонеально за одне введення за схемою, виявила збільшення кількості

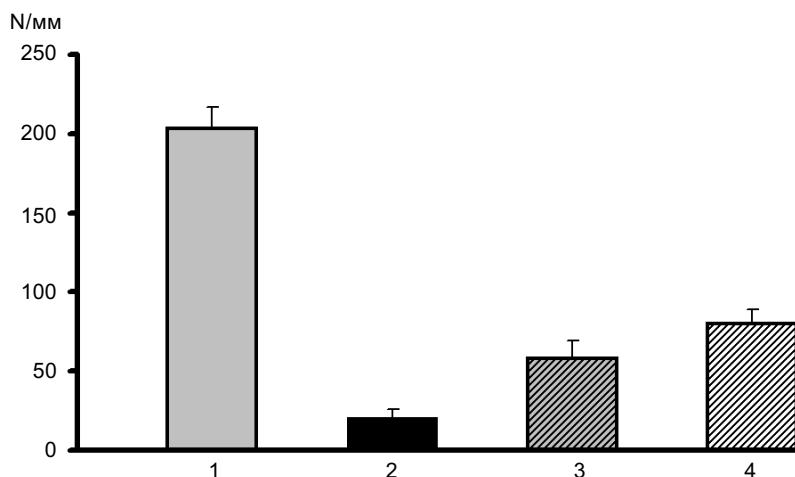


Рис. 2. Кількість неушкоджених нейронів (N) на 1 мм довжини в зоні СА1 гіпокампа у різних серіях дослідів: 1 – контроль, 2 – ішемія, 3 – введення кверцетину після ішемії, 4 – введення кверцетину до та після ішемії

пірамідальних нейронів, які виживали на 7-му добу після ішемії.

Кількість неушкоджених клітин на 1 мм довжини зони СА1 зони гіпокампа було такою:

Контроль 1	203 ± 14
Ішемія без введення кверцетину (контроль 2)	20 ± 6 (9,8,0 %)
Введення кверцетину після ішемії	58 ± 11 (28,6 %)
Введення кверцетину до та після ішемії	80 ± 9 (39,4 %)
Кількість полів зору	192

Кращі результати були отримані при профілактичному застосуванні препарату, тобто, порівняно з ішемією без ВК, у тварин IV групи збільшувалася кількість неушкоджених нейронів до 80 ± 9 клітин на 1 мм довжини зони СА1, що було майже на 30 % більше, ніж у групі ішемізованих тварин. Водночас у III групі, в якій тваринам препарат вводили тільки після ішемії, кількість неушкоджених нейронів збільшилася лише на 20 %. Такі нейрони мали велике світле округле ядро з одним чи двома ядерцями та вузьку смужку дещо темнішої цитоплазми навколо ядра та збережені апікальні дендрити (див. рис. 1, в, г).

Імуноцитохімічне дослідження показало, що у тварин з ішемією на 7-му добу спостерігалось значне (вдвічі) збільшення кількості ГКФБ-позитивних астроцитів у всіх шарах (str.pyramidale, str.radiatum, str.lacunosum-moleculare) середньої частини зони СА1 гіпокампа порівняно з контролем (рис. 3), тобто, проявлявся реактивний астроцитоз, що є неспецифічною реакцією нервової тканини на пошкодження мозку. Позитивно мічені астроцити набували яскраво виражену гіпертрофовану структуру: об'єм тіла і відростків клітин збільшувався (рис. 4). Процес реактивного астрогліозу

йде паралельно з відстроченою загибеллю нейронів, що дозволяє припустити поєднану пошкоджувальну дію ішемії–реперфузії на різні клітини нервової тканини.

Застосування ВК у тварин з ішемією гальмувало розвиток реактивного астроцитозу. Це проявлялося у тому, що кількість мічених астроцитів збільшувалась лише в 1,5 раза порівняно з контролем (див. рис. 3). Хоча механізм, за допомогою якого активовані астроцити беруть участь у постішемичних процесах ще недостатньо зрозумілий, одержані результати збігаються з думкою деяких дослідників [27] про те, що астроцити реагують на збільшення кількості вільних радикалів і можуть виявляти нейропротекторні властивості в умовах ішемічного пошкодження мозку.

У проведених дослідженнях були використані різні схеми введення ВК відповідно до ішемічного впливу. Слід зазначити, що більш виражена протекторна дія виявляється при профілактичному введенні ВК – за 2 год до перетискання сонних артерій. Цей результат дозволяє припустити, що більший ефект у лікувальній практиці може виявитися при вживанні цього препарату у хворих з ризиком розвитку цереброваскулярних порушень з профілактичною метою.

Таким чином, проведені нами дослідження свідчать про досить ефективний протекторний вплив водорозчинного кверцетину при ішемії–реперфузії мозку.

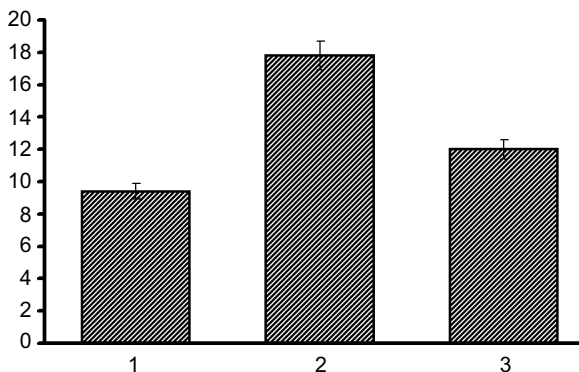


Рис.3. Кількість астроцитів на одиницю площі зрізу в зоні СА1 гіпокампа: 1 – контроль, 2 – ішемія, 3 – введення кверцетину після ішемії

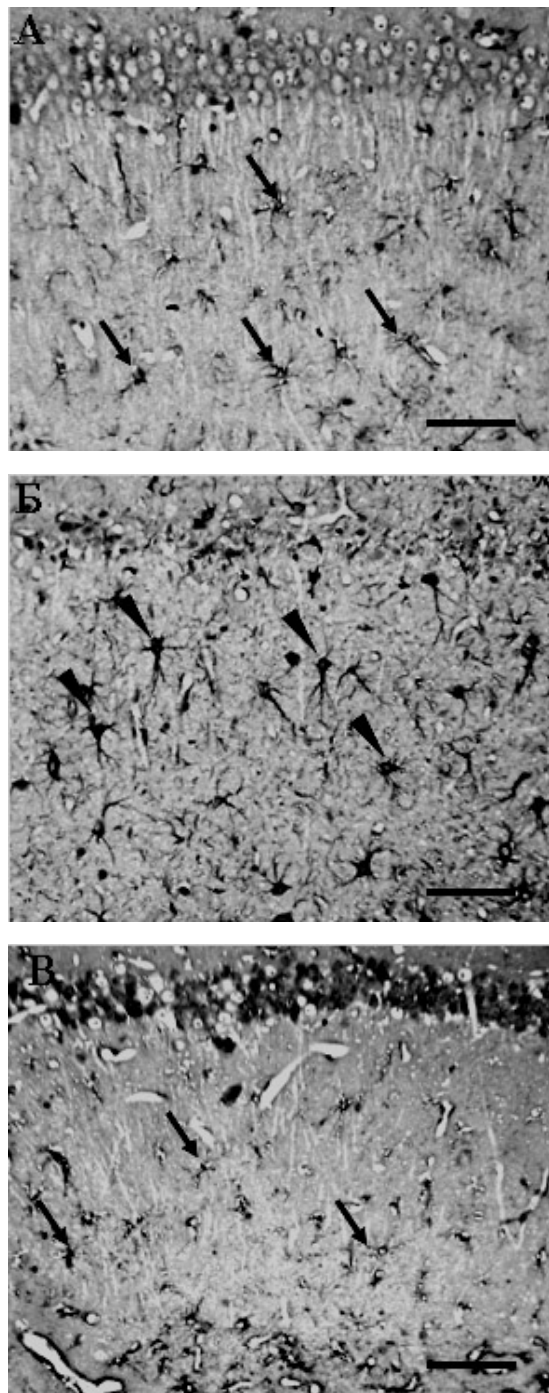


Рис.4. Імуноцитохімічна реакція астроцитів зони СА1 гіпокампа на 7-му добу після ішемії: а – контрольна група, б – тварини з ішемією, в – тварини з ішемією, яким вводили кверцетин. Чорними стрілками відмічені неактивовані астроцити (а і в), активовані (гіпертрофовані) астроцити (б) відмічені трикутниками. Шкала – 50 мкм

**Т.М.Коваленко, І.О.Осадченко, О.М.Цупиков,
Т.А.Півнева, А.С.Шаламай, О.О.Мойбенко,
Г.Г.Скибо**

**NEUROPROTECTIVE EFFECT OF QUERCETIN
UNDER EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA.**

The neuroprotective action by water-soluble form of quercetin was examined in gerbils after transient forebrain ischemia. The animals were exposed to 7 min of bilateral common carotid artery occlusion. Hippocampal CA1 area was examined 7 days after ischemia-reperfusion. The average density of CA1 pyramidal neurons and GFAP-positive glial cells were counted in sham operated group, in ischemic group and in the groups treated with water-soluble form of quercetin. It was shown that quercetin revealed protective effect by decreasing of delayed neuronal death and reducing reactive astrogliosis after ischemia-reperfusion.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зозуля Ю.А., Барабой В.А., Сутковой Д.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. – М.: Знание, 2000. – 344 с.
2. Ковалев В.Б., Ковган В.В., Колчина Е.Ю. Механизмы лечебного действия биофлавоноида кверцетина (обзор литературы) // Укр. мед. альманах. – 1999. – 2, №4. – С.176–184.
3. Максютіна Н.П., Мойбенко О.О., Пархоменко О.М. та ін. Використання нових лікарських форм кверцетину при ішемічних та радіаційних ушкодженнях: Метод. рекомендації. – К., 2000. – 13 с.
4. Максютіна Н.П., Мойбенко О.О., Пилипчук Л.Б. та ін. Спосіб одержання корвітину / Пат. України № 23996 А, 1998.
5. Мойбенко А.А., Пархоменко А.Н., Кожухов С.Н. Эффективность водорастворимой формы кверцетина (корвитина) при лечении острого коронарного синдрома с элевацией сегмента ST // Журн. АМН Украины. – 2003. – 9, № 2. – С. 361–370.
6. Пархоменко А.Н., Мойбенко А.А., Колчин Ю.Н. и др. Способ лечения острого инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии / Пат. России № 2016569, 19.
7. Chan P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain // J.Cereb. Blood Flow Metab. – 2000. – 21. – P.2–14.
8. Das D. K. Cellular, biochemical and molecular aspects of reperfusion injury. – New York, 1994. – 151 p.
9. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view // Trends Neurosci. – 1999. – 22. – P.391–397.
10. Horn M., Schlote W. Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia // Acta Neuropathol. – 1992. – 85. – P.79–87.
11. Huk I., Brovkovych V., Nanobashvili I. et al. Bioflavonoids quercetin scavenge superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemic-reperfusion injury: an experimental study // Brit. J. Surg. – 1998. – 85, № 8. – P.1080–1085.
12. Kato R., Araki T., Kogure K., Murakami N., Uemura K. Sequential cerebral blood flow changes in short-term cerebral ischemia in gerbils // Stroke. – 1990. – 21. – P.1346–1349.
13. Kirino T. Delayed neuronal death // Neuropathology. – 2000. – 20. – P.S95–S97.
14. Kirino T., Tamura A., Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia – reversible and irreversible types of ischemic cell damage // Progr. Brain Res. – 1985. – 63. – P.39–58.
15. Kitagawa K., Matsumoto M., Oda T. et al. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death // Neuroscience. – 1990. – 35, №3. – P.551–558.
16. Li C., Jackson R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2002. – 282, Issue 2. – P.C227–C241.
17. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol. Rev. – 1999. – 79, №4. – P.1431–1568.
18. Mattson M.P., Liu D. Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders // Neuromolecular Med. – 2002. – 2, №2. – P.215–231.
19. Middleton E.Jr. Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells implications for inflammation, heart disease, and cancer // Pharmacol. Rev. – 2000. – 52, №4. – P.673–751.
20. Mokudai T., Ayoub I.A., Sakakibara Y. et al. Delayed treatment with nicotinamide (vitamin B₃) improves neurological outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in Wistar rats // Stroke. – 2000. – 31. – P.1679–1685.
21. Nitatori T., Sato N., Waguri S. et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis // J. Neuroscience. – 1995. – 15, №2. – P. 1001–1011.
22. Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A., Gage F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function // Trends Neurosci. – 1997. – 20. – P. 570–577.
23. Robak J., Gryglewski R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions // Biochem. Pharmacol. – 1988. – 37, № 5. – P. 831–841.
24. Schmidt-Kastner R., Freund T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia // Neuroscience. – 1991. – 40, №3. – P. 599–636.
25. Sun A.Y., Chen Y.M. Oxidative stress and neurodegenerative disorders // J.Biomed. Sci. – 1998. – 5. – P.401–414.
26. Wang Q., Xu J., Rottinghaus G.E. et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils // Brain Res. – 2002. – 958. – P. 439–447.
27. Wilson J.K. Antioxidant defense of the brain: a role of astrocytes // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1997. – 75. – P.1149–1163.

*Матеріал надійшов до
редакції 16.03.2006*

In-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ