

Терапия фетальными нервными клетками в остром периоде экспериментального ишемического инсульта (антиоксидантный эффект)

UDC 612.822.014-053.1:615.014.41:616.831-005.1

D.V. LEBEDINETS¹, S.Ye. OVSYANNIKOV¹, V.V. LEBEDINETS², M.V. OSTANKOV¹, A.N. GOLTSEV^{1*}

Therapy with Fetal Neuronal Cells in Acute Period of Experimental Ischemic Stroke (Antioxidative Effect)

В работе представлены результаты исследования влияния криоконсервированных фетальных нервных клеток (кФНК) на динамику неврологического дефицита и состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в остром периоде ишемии мозга у белых крыс. Показано, что введение кФНК корригировало нарушение активности ПОЛ, снижало уровень свободнорадикальных метаболитов в веществе мозга, печени и сыворотке крови, усиливало эндогенную антиоксидантную защиту, улучшало клинический статус крыс и повышало показатель выживаемости животных. Проведенные исследования выявили достоверный защитный эффект введенных внутривентрикулярно кФНК в остром периоде экспериментальной ишемии мозга лабораторных животных. Полученные результаты позволяют считать перспективным применение кФНК в комплексном лечении ишемических нарушений мозгового кровообращения.

Ключевые слова: криоконсервированные фетальные нервные клетки, перекисное окисление липидов, ишемия мозга.

У роботі представлені результати дослідження впливу криоконсервованих фетальних нервових клітин (кФНК) на динаміку неврологічного дефіциту і стан процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у гострому періоді ішемії мозку білих щурів. Показано, що введення кФНК коригувало порушення активності ПОЛ, знижувало рівень вільнорадикальних метаболітів у речовині мозку, у печінці та сироватці крові, підсилювало ендогенний антиоксидантний захист, покращувало клінічний статус і підвищувало показник виживання тварин. Проведені дослідження виявили достовірний захисний ефект внутрішньочеревинного введення кФНК у гострому періоді експериментальної ішемії мозку лабораторних тварин. Отримані результати дозволяють вважати перспективним застосування кФНК у комплексному лікуванні ішемічних порушень кровообігу мозку.

Ключові слова: криоконсервовані фетальні нервові клітини, перекисне окислення ліпідів, ішемія мозку.

In this research there are presented the results of the effect of cryopreserved fetal neuronal cells (cFNCs) on the dynamics of neurological deficit and state of the processes of lipid peroxidation (LPO) in an acute period of brain ischemia in white rats. It has been shown that the introduction of cFNCs corrected the impairment of LPO activity, reduced the level of free radical metabolites in brain substance, liver and blood serum, strengthened endogenous antioxidant protection, improved clinical status of rats and increased the viability index of the animals. The carried-out studies revealed statistically significant effect of introduced intraperitoneally cFNCs in an acute period of experimental brain ischemia of laboratory animals. The findings enable the considering of the application of cFNCs in a combined treatment of ischemic impairments of brain blood circulation as perspective one.

Key words: cryopreserved fetal neuronal cells, lipid peroxidation, brain ischemia.

Согласно современным представлениям оксидативный стресс является первичной неспецифической реакцией организма на изменения как внешней среды, так и внутренних метаболических процессов. Если незначительные временные сдвиги прооксидантно-антиоксидантного равновесия приводят к интенсификации адаптационных процессов, повышающих резистентность организма к действию неблагоприятных факторов, то существенное ускорение реакций свободнорадикального окисления (СРО) биомолекул может вызывать различные патологии, в том числе ишемический инсульт (ИИ) [1, 6]. Основную опасность для нервных клеток при ИИ представляют истощение энергетических

According to current notions an oxidative stress is primary non-specific reaction of an organism on the changes of both environment and inner metabolic processes. Slight shifts of pro-oxidant/antioxidant balance result in intensification of adaptation processes, increasing an organism resistance to the effect of unfavorable factors, though significant acceleration of the reaction of free radical oxidation (FRO) of biological molecules may cause different pathologies, including ischemic stroke (IS) [1, 6]. For neuronal cells at IS the major threat is exhaustion of energetic stocks, surplus accumulation of exciting amino acids, rendering neurotoxic effect, and the formation of reactive oxygen species (ROS), associated to the leaking of electrons,

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Центральная клиническая больница Укрзалізниці, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+380 057) 373-57-91, факс: (+380 057) 373-30-84, электронная почта: cryopato@rambler.ru

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Central Clinical Hospital of Ukrainian Railways, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 5791, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryopato@rambler.ru

ресурсов, избыточное накопление возбуждающих аминокислот, оказывающих нейротоксическое действие, и образование активных форм кислорода (АФК), связанное с утечкой электронов, накапливающихся в промежуточных звеньях дыхательной цепи [1, 2]. Нарушение энергетического метаболизма приводит к изменению трансмембранных ионных потоков и накоплению кальция внутри нейронов. При этом развивается “атака” АФК на молекулы белков, нуклеиновых кислот и липидов, протекающая по механизму СРО [3, 4]. Неуправляемая и некомпенсированная активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), истощение эндогенных антиоксидантов [1, 7] и нарушение регуляторных механизмов антирадикальной защиты рассматриваются как ключевые звенья повреждения нейронов [6, 14]. Окислительная модификация белков под действием АФК вызывает изменение их конформационной организации с экспансией скрытых антигенных эпитопов и приобретением ими новых иммуногенных свойств [5, 17]. Активизирующийся в этих условиях ответ антител и образующиеся иммунные комплексы, в свою очередь, стимулируют активность фагоцитов и продукцию ими АФК. Кроме того, окисление липидов приводит к появлению хемоаттрактантов, усиливающих миграцию фагоцитов в очаг воспаления.

Патогенетическое значение интенсивности процессов ПОЛ и снижение антиоксидантной активности при развитии ИИ описаны в ряде клинико-биохимических исследований [10, 16]. Показано, что общепринятая терапия (реополиглюкин, эуфиллин, аспирин, курантил, трентал) не снижает высокую активность ПОЛ. Это явилось основанием для введения в схемы терапии ишемии мозга лекарственных средств, избирательно корректирующих активность реакций ПОЛ. Несмотря на очевидную перспективность антиоксидантной терапии при ишемических состояниях и полученные положительные результаты [7, 10, 11, 13, 14, 16], до сих пор не разработаны методы терапии для широкой клинической практики. В связи с этим необходим поиск новых способов коррекции уровня СРО в веществе мозга при гипоксических и ишемических состояниях. Одним из методов лечения ИИ может быть тканевая терапия, которая занимает в последнее время ведущие позиции при лечении различных нейропатологий.

Цель работы – оценить влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на динамику неврологического дефицита и состояние ПОЛ в остром периоде ИИ у белых крыс.

Материалы и методы

Исследование проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г в соответствии с

accumulated in intermediate links of the respiratory chain [1, 2]. Impaired energetic metabolism leads to the change in trans-membrane ion fluxes and accumulation of calcium inside neurons. Herewith the “attack” of ROS to protein molecules, nucleic acids and lipids, proceeding on FRO mechanism, develops [3, 4]. Uncontrolled and non-compensated activation of the processes of lipid peroxidation (LPO), exhaustion of endogenous antioxidants [1, 7] and disorder of regulatory mechanisms of antiradical protection are considered as key links of neuron impairment [6, 14]. Oxidative modification of proteins under the effect of ROS causes the changes in their conformational organization with the expansion of hidden antigen epitopes and gaining by them of new immunogenic properties [5, 17]. Activating under these conditions response of antibodies and forming immune complexes, in their turn, stimulate the activity of phagocytes and ROS production by them. In addition, lipid oxidation results in the appearance of chemoattractants, strengthening the migration of phagocytes into the inflammation focus.

Pathogenetic value of the intensity of LPO processes and reduced antioxidant activity at IS are described in some clinical and biochemical studies [10, 16]. It has been shown that traditional therapy (reopolyglukin, euphyllinum, aspirin, dipyridamolum, pentoxifylline) does not reduce high LPO activity. This was the reason to introduce into the brain ischemia therapy protocol the drugs, selectively correcting the activity of LPO reactions. In spite of evident prospects of antioxidant therapy under ischemic states and the obtained positive results [7, 10, 11, 13, 14, 16], no therapeutical methods have been designed yet for a wide clinical practice. In this connection there is a need in searching the new ways of correction of FRO level in brain substance at hypoxic and ischemic states. One of the treatment methods of IS may be tissue therapy, which has taken the leading positions in the treatment of different neuropathologies recently.

The research aim is to assess the effect of cryopreserved fetal neuronal cells on the dynamics of neurological deficit and LPO state in IS acute period in white rats.

Materials and methods

The studies were carried-out in male Wistar rats of 180–200g mass in the accordance with the “General principles of the experiments in animals”, approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007).

Brain ischemia was caused with occlusion of medial cerebral artery (MCAo) in the left hemisphere according to the method reported [8]. Rats were introduced with ketamine (125 mg/kg) intraperitoneally. During the surgery and prior to the postanesthetic recovery the body temperature of animals was maintained at the level of 37°C with the standard method. Operational wound was sutured by layers.

"Общими принципами экспериментов на животных", одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007).

Ишемию мозга вызывали окклюзией средней мозговой артерии (СМАо) в левом полушарии по методу [8]. Крысам вводили кетамин (125 мг/кг) внутривентриально. Во время операции и до выхода из наркоза температуру тела животных поддерживали на уровне 37°C стандартным методом. Операционную рану послойно ушивали.

Суспензию фетальных нервных клеток (ФНК) получали в стерильных условиях путем дезагрегации мягких тканей мозга плодов крыс 11-ти суток гестации с помощью гомогенизатора Поттера. Криоконсервировали ФНК под защитой 10%-го раствора ДМСО на программном замораживателе УООП-6 производства СКТЬ с ОП при ИПКиК НАН Украины по методу [5]. Оттаивание проводили на водяной бане при 41°C. Криоконсервированные (кФНК) или нативные (нФНК) ФНК вводили внутривентриально по 0,5 мл (8×10^6 клеток на крысу) через 6 ч после СМАо.

Животных разделили на 5 групп: 1 – интактные (контроль); 2 – ИИ; 3 – ИИ + введение кФНК; 4 – ИИ + введение нФНК; 5 – ИИ + введение пирacetama на физиологическом растворе. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом на 3, 7 и 28-е сутки после инициации ИИ и лечения. Влияние введенных ФНК на течение ИИ оценивали по динамике показателей клинических проявлений – выраженности общемозговой и локальной неврологической симптоматики с определением Stroke-Index по С. McGrow [6], а также по показателю выживаемости животных.

Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию активных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП) в крови, мозгу и печени, [3]. В печени определяли активность каталазы [9], содержание глутатионпероксидазы [19], глутатионредуктазы [15], общую антиокислительную активность (АОА) [19], содержание восстановленного глутатиона [12]. Содержание белка в тканях определяли в биуретовой реакции [18].

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрическим методом Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

При исследовании ПОЛ на модели экспериментального ИИ у всех животных было выявлено существенное изменение его интенсивности. При этом установлены определенные тканеспецифические особенности. На 3-и сутки эксперимента в гомогенатах мозга и печени животных с ИИ (груп-

The suspension of fetal neuronal cells (FNCs) was derived under sterile conditions by means of desaggregation of brain soft tissues of rat fetuses of the 11-days' gestation by means of Potter homogenizer. FNCs were cryopreserved under protection of 1% DMSO solution using programmable freezer UOP-6 (Special Designing Constructing and Technical Bureau at the IPC&C of National Academy of Sciences of Ukraine) according to the method [5]. Thawing was done in water bath at 41°C. Cryopreserved (cFNCs) or native (nFNCs) cells were intraperitoneally introduced by 0.5 ml (8×10^6 cells per rat) 6 hrs later MCAo.

Animals were divided into 5 groups: 1 – intact (control); 2 – IS; 3 – IS + introduction of cFNCs; 4 – IS + introduction of nFNCs; 5 – IS + introduction of piracetam with physiological solution. The rats were taken from the experiments by decapitation under slight ether narcosis to the 3, 7 and 28th days after IS initiation and treatment. Effect of introduced FNCs on the proceeding of IS was assessed on the dynamics of the indices of clinical manifestations: expression of general cerebral and local neurological symptoms with examining the Stroke-index according to С. McGrow [6], as well as on the index of the survival of animals.

LPO intensity was estimated on the content of substances reacting with thiobarbituric acid (TBARS) in blood, brain and liver [9]. The following indices were found in liver: content of glutathione peroxidase [19], glutathione reductase [15], total antioxidant activity (AOA) [19], content of reduced glutathione [12]. Protein content in tissues was determined by means of biuret reaction [18].

The findings were statistically processed by parametrical method using the Student's t-criterion and non-parametrical method using Mann-Whitney's criterion.

Results and discussion

When investigating LPO in the model of experimental IS in all the animals the change in its intensity was found. Herewith the certain tissue-specific peculiarities were established. To the 3rd experimental day in brain and liver homogenates of animals with IS (group 2) the content of TBARS statistically and significantly exceeded the control value and to the 7th day this index of LPO in brain continued the growth and somewhat decreased to the 28th day, herewith remaining significantly higher than the control (Fig. a). At the same time in liver homogenates the changes in this index had the dynamics, reverse to the augmenting of neurological manifestations and significantly reduced to the 7th day with a slight rise to the 28th day (Fig. b). In addition, the changes in the TBARS content in brain and liver of rats after the therapy, though they had similar orientation if compared with the control, were more manifested in brain homogenates (Fig. a). It should be noted that the studied indices approached

па 2) содержание ТБКАП достоверно превышало контрольное значение, а к 7-м суткам в мозгу данный показатель ПОЛ продолжал расти и несколько снизился к 28-м суткам, при этом оставаясь значительно выше контроля (рисунок, а). В то же время, в гомогенатах печени изменения этого показателя имели динамику, обратную нарастанию неврологических проявлений, и значительно уменьшались к 7-м суткам с небольшим повышением на 28-е сутки (рисунок, б). Кроме того, изменения содержания ТБКАП в мозгу и печени крыс после лечения, хотя и имели одинаковую направленность по сравнению с контролем, были более выражены в гомогенатах мозга (рисунок, а). Следует отметить, что исследуемые показатели наиболее приближались к контролю после введения крысам ФНК (группы 3 и 4), в отличие от животных, получавших пирацетам (группа 5).

Общая антиокислительная активность сыворотки крови достоверно повышалась на 7-е сутки развития ИИ по сравнению с контрольными значениями и оставалась на том же уровне к 28-м суткам. При этом содержание ТБКАП в сыворотке увеличивалось на протяжении всего исследуемого срока развития заболевания (табл.1).

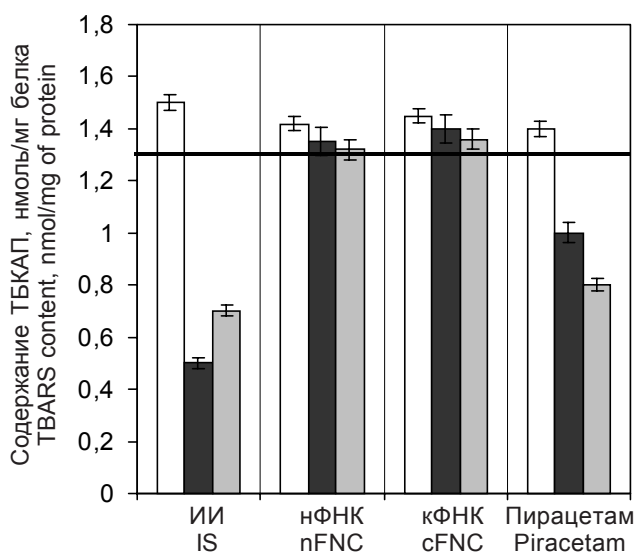
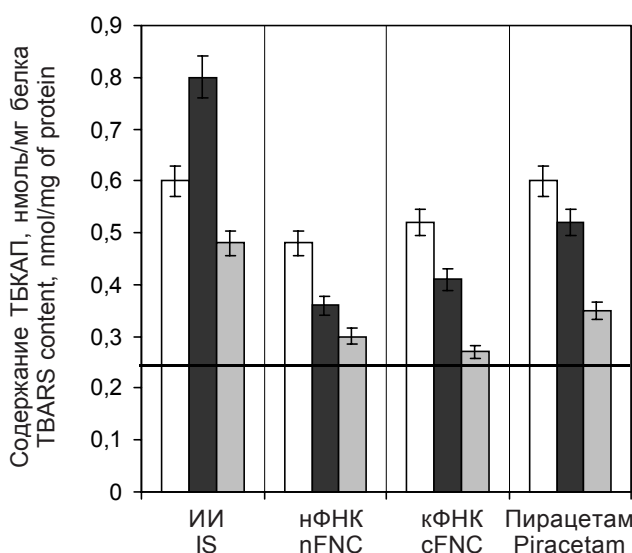
Приведенные результаты согласуются с современными концепциями о физиологической роли ПОЛ [1, 16]. Наивысшие показатели содержания ТБКАП в гомогенатах печени и мозга отмечены в период доклинической фазы развития заболевания, что свидетельствует о патогенетическом вкладе ПОЛ в развитие ИИ. Можно предположить, что снижение содержания ТБКАП в мозгу в период

more to the control after the introduction to rats of FNCs (groups 3 and 4) in contrast to the animals received piracetam (group 5).

Total antioxidant activity of blood serum statistically and significantly increased to the 7th day of IS development if compared with the control values and remained at the same level to the 28th day. Herewith the content of TBARS in the serum increased during the whole period of disease development (Table 1).

The presented results conform with the current conceptions about physiological role of LPO [1, 16]. The highest indices of TBARS content in liver and brain homogenates are noted in the period of pre-clinical phase of disease development, that testifies to pathogenetic contribution of LPO into IS development. One can suppose that the reduction of TBARS content in brain during an acute phase is likely related to the exhaustion of brain LPO substrates because of quite rapid destruction of myelin and release of free fatty acids into liquor and via BBB into blood channel. Simultaneous rise in TBARS content in blood serum partially confirms this supposition. Similar orientation of the processes is found in the animals during an acute phase of IS [13, 14]. Consequently, the obtained data about the effect of biochemical changes on the induction of immune inflammatory process once again confirm the systemic character of the development of autoimmune diseases as IS.

It is known that the change in ROS concentration, activity of enzyme antioxidant system, content of low molecular antioxidants, as well as the regeneration system of reducing equivalent donors may affect pro-oxidant/antioxidant homeostasis [14]. The data of Table 2



а Содержание ТБКАП в мозгу (а), печени (б) у крыс при развитии экспериментального ИИ и после лечения: □ – на 3-и сутки; ■ – 7-е сутки; ▒ – 28-е сутки; — — контроль.

Content of TBARS in rat brain (a) and liver (b) during development of experimental IS and after treatment: □ – to the 3rd day; ■ – 7th day; ▒ – 28th day; — — the control.

острой фазы, по-видимому, связано с истощением субстратов ПОЛ головного мозга вследствие достаточно быстрой деструкции миелина и выхода свободных жирных кислот в ликвор и через гематоэнцефалический барьер в кровяное русло. Одновременное повышение содержания ТБКАП в сыворотке крови частично подтверждает данное предположение. Подобная направленность процессов отмечена у животных в остром периоде ИИ [13, 14]. Следовательно, полученные данные о влиянии биохимических изменений на индукцию иммуновоспалительного процесса еще раз подтверждают системный характер развития аутоиммунных заболеваний на примере ИИ.

Известно, что на прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз могут влиять изменение концентрации АФК, активность ферментативной антиоксидантной системы, содержание низкомолекулярных антиоксидантов, а также система регенерации доноров восстановительных эквивалентов [14]. Данные табл. 2 свидетельствуют о значительном снижении активности изученных антиоксидантных ферментов и содержании восстановленного глутатиона, а также о снижении активности глутатион-6-фосфатдегидрогеназы – фермента, синтезирующего НАДФН в печени крыс в остром периоде ИИ. В то же время после введения животным ФНК данные показатели практически не отличались от контроля (табл. 2).

На основе данных о патогенетически значимом повышении активности ПОЛ и снижении уровня эндогенных антиоксидантов в сыворотке крови у животных изучали влияние ФНК на эти процессы при ИИ в зависимости от степени неврологического дефицита. У крыс групп 3 и 4 установлено положительное влияние введенных кФНК или нФНК на показатели ПОЛ, а также на корреляцию между динамикой клинического статуса и уровнем ПОЛ. Так, в случае позитивного клинического эффекта препарата у крыс отмечалась тенденция к депонированию эндогенных антиоксидантов и снижению способности липидов к окислению. Наиболее существенная коррекция показателей ПОЛ отмечалась у крыс группы 3 после введения кФНК. У них повышался уровень эндогенных антиоксидантов, что свидетельствовало об усилении эндогенной антиоксидантной защиты.

Вероятно, высокая терапевтическая эффективность применения ФНК в остром периоде ИИ обусловлена тем, что они, обладая широким спек-

Таблица 1. Содержание ТБКАП (нмоль МДА/мл) и АОА (%) в сыворотке крови крыс при развитии экспериментального ИИ и после лечения

Table 1. Content of TBARS (nmol/ml) and AOA (%) in rat blood serum with IS and after introduction of drugs

Группа животных Group of animals	Показатель Index	Срок исследования, сутки Observation term, days		
		3	7	28
1 (n = 6)	ТБКАП TBARS	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2*
	АОА	49,0 ± 2,3	49,0 ± 2,3*	49,0 ± 2,3*
2 (n = 6)	ТБКАП TBARS	2,67 ± 0,4	3,2 ± 0,6	3,5 ± 0,8
	АОА	56,4 ± 2,4*	59,0 ± 2,0*	58,9 ± 2,2*
3 (n = 12)	ТБКАП TBARS	2,89 ± 0,2*	2,75 ± 0,7	2,62 ± 0,2
	АОА	52,0 ± 1,2	50,8 ± 2,1	50,4 ± 1,2
4 (n = 12)	ТБКАП TBARS	2,95 ± 0,6	3,0 ± 0,4	2,6 ± 0,6
	АОА	52,6 ± 2,0	51,5 ± 0,5	50,9 ± 1,3
5 (n = 12)	ТБКАП TBARS	3,0 ± 0,4	2,95 ± 0,2*	3,2 ± 0,3*
	АОА	54,0 ± 2,1	53,2 ± 2,7	52,4 ± 3,1

Примечание: * – достоверные различия ($P < 0,05$) в сравнении с контролем.

Note: * – the significant differences, if compared with the control ($P < 0.05$).

testify to a significant reduction in the activity of the studied antioxidant enzymes and content of reduced glutathione, as well as a decrease in the activity of glutathione-6-phosphate dehydrogenase, the enzyme synthesizing NADPH in rat liver in an acute period of IS. At the same time after the FNCs introduction to the animals these indices almost did not differ from the control (Table 2).

On the base of the data about pathogenetically significant rise in LPO activity and reduction of the level of antioxidants in blood serum of animals there was studied the effect of FNCs on these processes at IS depending on the extent of neurological deficit. In the rats of groups 3 and 4 a positive effect of the introduced either cFNCs or nFNCs on LPO indices was found, as well as correlation between the dynamics of clinical status and LPO level. For example, in the case of positive clinical effect of the preparation in rats there was noted the tendency to depositing of endogenous antioxidants and reduction of the ability to lipid oxidation. The most significant correction of LPO indices was found in the rats of group 3 after cFNCs introduction. The level of endogenous antioxidants was increased, testifying to the strengthening of endogenous antioxidant protection.

Таблица 2. Состояние антиоксидантной защиты печени у крыс при развитии экспериментального ИИ и после лечения

Table 2. State of antioxidant protection of rat liver during experimental IS and after treatment

Показатель Index	Группа животных Group of animals				
	1	2	3	4	5
GSH, ммоль/г GSH, mmol/g	5,5 ± 0,5	5,4 ± 0,6	7,1 ± 0,7	6,7 ± 0,67	5,3 ± 0,5
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ /мг белка/мин Catalase, mmol of H ₂ O ₂ /mg of protein/min	120,3 ± 12,6	59,8 ± 6,2*	132,4 ± 14,2	126,0 ± 16,0	91,3 ± 8,3*
ГП, нмоль НАДФН/мг белка/мин GP, nmol of NADPH/mg of protein/min	0,312 ± 0,2	0,164 ± 0,2*	0,301 ± 0,1	0,292 ± 0,2	0,212 ± 0,2*
ГР, нмоль НАДФН/мг белка/мин GR, nmol of NADPH/mg of protein/min	19,8 ± 1,8	7,0 ± 1,2*	13,9 ± 2,6	14,5 ± 1,5	9,0 ± 1,1*
Г6ФДГ, нмоль НАДФН/мг белка/мин G6PDH, nmol of NADH/mg of protein/min	19,2 ± 1,9	6,7 ± 0,9*	18,8 ± 2,3	19,0 ± 1,8	8,6 ± 1,0*

Примечания: GSH – восстановленный глутатион, ГП – глутатионпероксидаза, ГР – глутатионредуктаза, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, * – достоверные различия ($P < 0,05$) в сравнении с контролем.

Notes: GSH – reduced glutathione, GP – glutathione peroxidase, GR – glutathione reductase, G6PDH – glucose-6-phosphate dehydrogenase, * – the significant differences, if compared with the control ($P < 0.05$).

ром ростовых факторов, ингибировали СРО мембранных липидов, достоверно снижая в веществе мозга уровень продуктов ПОЛ – диеновых и триеновых конъюгатов, шиффовых оснований – и, возможно, регулировали активность фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, увеличивая в мозгу содержание цАМФ. Кроме того, они способствовали повышению активности антиоксидантных ферментов: каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, а также торможению свободно-радикальных стадий синтеза простагландинов и образованию лейкотриенов.

Изученные показатели ПОЛ у крыс с легким, средним и тяжелым течением ИИ во все сроки наблюдения были сопоставимыми. Так, к 28-м суткам на фоне уменьшения неврологических изменений у выживших животных отмечалось падение активности антиоксидантных ферментов в печени: каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, которые снижают уровень ПОЛ. У 5% выживших животных отмечали незначительное повышение уровня эндогенных антиоксидантов.

При общей оценке неврологического статуса крыс с ИИ в процессе лечения криоконсервированными или нативными ФНК не удалось выявить

High therapeutic efficiency of FNCs application in an acute IS period is probably stipulated with the fact that they possess wide spectrum of growth factors and inhibit FRO of membrane lipids, decreasing statistically and significantly the level of LPO products in the brain tissue: diene and triene conjugates, Schiff bases, and probably regulate the activity of phosphodiesterase of cyclic nucleotides, increasing the content of cAMP in the brain. In addition, they contributed to the rise in activity of antioxidant enzymes: catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, as well as inhibition of free radical stages of prostaglandins' synthesis and formation of leukotrienes.

Investigated LPO indices in the rats with mild, moderate and severe course of IS within all the observation terms were similar. For example, to the 28th

day on the background of diminishing the neurological changes in the survived animals there was found the fall in the activity of antioxidant enzymes in liver: catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, which inhibit the LPO. In 5% survived animals an insignificant rise in the level of endogenous antioxidants was noted.

General estimation of the neurological status in rats with IS did not reveal the significant differences between indices after treatment with either cryopreserved or native FNCs. However, during analysis of total points of neurological deficit some peculiarities depending on severity rate of the stroke were revealed to the 7th day. The dynamics of neurological deficit in the rats with moderate and mild stroke occurred to be similar to the parameters of the control group. At the same time in the rats with severe IS on the background of FNCs treatment there was achieved the stabilization of neurological status in comparison with the animals of the group 5, wherein the enhancement of locomotory disorders was found (Table 3).

Thus, the effect of FNCs introduction on LPO indices in the rats with IS progression depended on the extent of neurological deficiency. The preparation was more effective when treating the rats with IS of moderate and mild severities. The effect of bioactive substances in FNCs, having a wide spectrum of physio-

существенной разницы. Однако при анализе суммарного балла неврологического дефицита к 7-м суткам в зависимости от степени тяжести инсульта были выявлены некоторые особенности. Оказалось, что у крыс со среднетяжелым и легким инсультом динамика неврологического дефицита при лечении ФНК достоверно не отличалась от параметров контрольной группы. В то время как у крыс с тяжелой степенью ИИ на фоне лечения ФНК достигалась стабилизация неврологического статуса по сравнению с животными группы 5, в которой отмечалось нарастание двигательных расстройств (табл. 3).

Таким образом, влияние введения ФНК на показатели ПОЛ у крыс с развитием ИИ зависело от степени неврологического дефицита. Препарат оказался более эффективным при лечении ИИ средней и легкой степени тяжести. Очевидно, действие биоактивных веществ в ФНК, обладающих широким спектром физиологической активности, может быть связано как с прямой антиоксидантной активностью, так и со стабилизирующим их влиянием на биомакромолекулы, способные регулировать активность ферментов системы антиоксидантной защиты. Выраженный антиоксидантный эффект ФНК сочетается с их низкой иммуногенностью и высокой способностью к миграции. Выраженное противогипоксическое действие ФНК на моделях экспериментальной ишемии мозга у крыс, одним из основных патогенетических факторов которого является активация процессов ПОЛ, показало его эффективность при данной патологии.

Крысы групп 3 и 4, которым были введены ФНК, быстрее восстанавливали ритмическое дыхание и активную позу, чем животные группы 2, которые были не способны выполнять эти функции с развитием ИИ. Если крысы группы 2 утрачивали способность поддерживать данные функции соответственно через $44 \pm 3,6$ и $106 \pm 10,1$ с, то для животных с введением ФНК, эти параметры составили 85 ± 13 и $200 \pm 2,3$ с. Восстановление физиологической активности у крыс группы 3 и особенно группы 4 по сравнению с животными, не получавшими лечение ФНК, происходило в 1,5 раза быстрее – за 255 ± 16 и 381 ± 73 с соответственно.

Введение кФНК оказалось более эффективным, чем применение традиционной терапии (введение пирacetama). Проведенный анализ выживаемости

Таблица 3. Динамика неврологического дефицита после введения ФНК крысам с разной степенью развития экспериментального ИИ, баллы

Table 3. Dynamics of neurological deficiency after introduction of FNCs to rats with different degree of experimental IS progression, points

Группа животных Group of animal	Степень неврологического дефицита Extent of neurological deficit	Исходный показатель Initial level	Изменение на 7-е сутки Changes to 7 th day
3	Тяжелая Severe	13,6 1,1	+ 0,9
	Средняя Moderate	32,0 1,1	+ 6,3
	Легкая Mild	48,2 0,8	+ 8,4
4	Тяжелая Severe	13,6 1,1	+ 1,1
	Средняя Moderate	32,0 1,1	+ 5,8
	Легкая Mild	48,2 0,8	+ 8,4
5	Тяжелая Severe	13,4 1,3	+ 0,5
	Средняя Moderate	31,6 1,2	+ 2,5
	Легкая Mild	48,6 0,6	+ 11,5

logical activity, may be obviously associated both with a direct antioxidative activity and their stabilizing effect on biомакромолекулы, being able to regulate an activity of antioxidant protection system enzymes. The expressed antioxidant effect of FNCs combines with their low immunogenicity and high capacity to migration. The expressed anti-hypoxic effect of FNCs in the models of experimental cerebral ischemia in rats, one of the main pathogenetic factors of which was the activation of LPO processes, demonstrated its efficiency under this pathology.

The rats of the 3rd and 4th groups, introduced with FNCs recovered faster the rhythmic breathing and the active position if compared with the animals of the 2nd group, which were not able to perform these functions at IS progression. The rats of the 2nd group lost the ability of maintaining these functions in 44 ± 3.6 and 106 ± 10.1 sec, correspondingly, though for the animals with the introduction of FNCs these parameters made 85 ± 13 and 200 ± 2.3 sec. Recovery of physiological activity in the rats of 3rd group and especially in the 4th one, if compared with the animals, not treated with FNCs, was in 1.5 times faster for 255 ± 16 and 381 ± 73 sec, correspondingly.

Introduction of cFNCs was more effective than the application of traditional therapy (introduction of piracetam). The carried-out analysis of the animals'

Таблица 4. Эффективность применения кФНК при экспериментальном ИИ у крыс
Table 4. Application efficiency of cFNCs during experimental IS in rats

Тяжесть неврологической симптоматики (баллы Stroke-Index) Severity of neurological symptoms (Stroke Index points)	Группа животных Group of animals		P
	3 (n = 15)	5 (n = 15)	
Отсутствие неврологических изменений The absence of neurological changes	13 (2)	0	—
Легкая степень (1 балл) Mild degree (1 point)	40 (6)	7 (1)	—
Всего Total	53 (8)	7 (1)	< 0,01
Средняя степень (до 5 баллов) Moderate degree (up to 5 points)	13,5 (2)	27 (4)	—
Тяжелая степень (более 5 баллов) Severe degree (above 5 points)	13,5 (2)	33 (5)	—
Всего Total	27 (4)	60 (9)	< 0,01
Летальность (на 3 сутки) Mortality (by the 3 rd day)	20 (3)	33 (5)	< 0,05
Средний показатель тяжести, баллы Medium index of severity, points	2,1 ± 0,3	6,7 ± 0,7	< 0,01

Примечание: приведен процент от количества животных в группе, в скобках указано абсолютное количество животных.
Note: percentage of animals in the group is presented, and in brackets the number of animals is shown.

животных показал, что у крыс группы 3 достоверно снижалась смертность в течение 3-х суток после СМАО по сравнению с группой 5, что составило 20 и 33% соответственно (табл. 4).

Отмечено, что число случаев тяжелой и средней неврологической симптоматики уменьшилось вдвое и существенно увеличилось (в 7 раз) при легком течении экспериментальной ишемии мозга. У 40% животных, получавших кФНК, общее состояние можно было оценить как легкое. В группе 5 у 60% животных наблюдалось тяжелое и среднетяжелое течение экспериментальной ишемии мозга. Положительное действие кФНК проявлялось также в достоверном уменьшении показателя тяжести локальной и общемозговой симптоматики (Stroke-Index). Средний балл, характеризующий тяжесть неврологических нарушений, у животных группы 3 был в 2 раза ниже среднего балла в группе 5 (2,1 ± 0,3 и 6,7 ± 0,7 балла соответственно).

Выводы

1. Исследование влияния введения ФНК в остром периоде экспериментальной ишемии мозга выявило достоверный защитный эффект.

2. Введение ФНК способствовало более эффективной коррекции нарушений активности ПОЛ, снижению уровня свободнорадикальных метаболитов в веществе мозга, печени и сыворотке крови по сравнению с применением пирацетама.

3. Криоконсервированные и нативные ФНК способствовали уменьшению тяжести локальной и общемозговой неврологической симптоматики;

survival showed that in the rats of the 3rd group the mortality significantly decreased for 3 days after MCAo, if compared with the 5th group that made 20 and 33%, correspondingly (Table 4).

It has been noted that the number of animals with severe and moderate neurological symptoms decreased twice and the number of animals with the mild course of experimental cerebral ischemia significantly increased (in 7 times). General state of cFNC-treated animals could be estimated as mild in 40% animals. Severe and moderate course of experimental cerebral ischemia was observed in 60% animals of the 5th group. The positive effect of cFNCs was also manifested as significant decrease of severity index of local and whole-brain symptoms (Stroke-Index). An average index, characterizing severity of neurological disorders in the animals of the 3rd group was twice lower than an average index of the 5th group (2.1 ± 0.3 and 6.7 ± 0.7 points, correspondingly).

Conclusions

1. The study of cFNC introduction effect at an acute experimental cerebral ischemia manifested a significant protective effect.

2. Introduced cFNCs contributed to more effective correction of LPO activity disorders, decrease of free-radical metabolites level in cerebrum, liver and blood serum if compared with piracetam.

3. Cryopreserved and native FNCs contributed to the reduction in severity of local and whole-cerebral neurological symptoms; improved clinical status and increased animal survival.

улучшали клинический статус и повышали выживаемость животных.

4. Полученные экспериментальные результаты могут быть использованы в клинической практике при разработке комплексного лечения исследуемой патологии.

Литература

1. *Болдырева А.А., Стволinskiy С.Л., Федорова Т.Н.* Экспериментальные аспекты ишемии мозга и окислительного стресса // *Очерки ангионеврологии* / Под ред. З.А. Суслиной.– М.: Атмосфера, 2005.– С. 41–49.
2. *Верещагин Н.В., Танашиян М.М., Федорова Т.Н., Смирнова И.Н.* Антиоксиданты в ангионеврологии // *Нервные болезни*.– М.: Атмосфера, 2004.– С. 8–12.
3. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: Наука, 1972.– 252 с.
4. *Ганнушкина И.В.* Патофизиология нарушений мозгового кровообращения // *Очерки ангионеврологии* / Под ред. З.А. Суслиной.– М.: Атмосфера, 2005.– С. 17–41.
5. *Гольцев А.М., Гурина Т.М., Бабенко Н.Н.* Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток // *Проблемы криобиологии*.– 2003.– №1.– С. 46–50.
6. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга.– М.: Медицина, 2001.– 327 с.
7. *Задюченко В.С., Адашева Т.В., Сандомирская А.П.* Дисфункция эндотелия и артериальная гипертензия: терапевтические возможности // *Российский медицинский журнал*.– 2002.– Т. 10, №1.– С. 11–15.
8. *Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В.* Лабораторные животные.– Киев: Вища шк., 1983.– 252 с.
9. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.* Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело*.– 1988.– №1.– С. 16–19.
10. *Миронов Н.В., Михин В.П., Чернятина М.Л.* Эффективность некоторых кардиоцитопротекторов у больных артериальной гипертензией, осложненной острым ишемическим инсультом // *Эффективная фармакотерапия*.– 2008.– №2.– С. 18–23.
11. *Применение цитопротектора "Мексикор®" в комплексной терапии больных с острыми и хроническими формами нарушения мозгового кровообращения: Метод. пособие* / Под ред. М.А. Бородиной.– М., 2008.– 29 с.
12. *Путилина Ф.Е.* Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // *Методы биохимических исследований* / Под ред. М.И. Прохоровой.– Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982.– С. 183–185.
13. *Столярова В.В.* Исследование кардиопротективного действия препаратов с антиоксидантной активностью при острой ишемии головного мозга // *Эксперим. и клин. фармакология*.– 2001.– Т. 64, №6.– С. 31–33.
14. *Суслина З.А., Федорова Т.Н., Максимова М.Ю. и др.* Антиоксидантная терапия при ишемическом инсульте // *Журнал неврологии и психиатрии*.– 2000.– Т. 100, №10.– С. 34–39.
15. *Чернов Н.Н.* Исследование глутатионредуктазы в печени крыс // *Энзимология опухолей*.– М.: Ун-т Дружбы народов, 1979.– С. 96–101.
16. *Федорова Т.Н.* Перекисное окисление липидов при ишемии мозга и возможности его фармакологической

4. The obtained experimental results may be used in clinical practice during the designing of a combined treatment of the studied pathology .

References

1. *Boldyreva A.A., Stvolinskiy S.L., Fedorova T.N.* Experimental aspects of brain ischemia and oxidative stress // In: *Angioneurology essays* / Ed. by Z.A. Suslina.– Moscow: Atmosfera, 2005.– P. 41–49.
2. *Vereschagin N.V., Tanashyan M.M., Fedorova T.N., Smirnova I.N.* Antioxidants in angioneurology // In: *Nervous diseases*.– Moscow: Atmosfera, 2004.– P. 8–12.
3. *Vladimirov Yu.A., Archakov A.I.* Lipid peroxidation in biological membranes.– Moscow: Nauka, 1972.– 252 p.
4. *Gannushkina I.V.* Pathophysiology of brain blood circulation disorder // In: *Angioneurology essays* / Ed. by Z.A. Suslina.– Moscow: Atmosfera, 2005.– P. 17–41.
5. *Goltsev A.N., Gurina T.M., Babenko N.N., Ostankov M.V.* Effect of different cryopreservation regimens on some characteristics of embryonic neuronal cells// *Problems of Cryobiology*.– 2003.– N1.– P. 46–50.
6. *Gusev E.I., Skvortsova V.I.* Brain ischemia.– Moscow: Meditsina, 2001.– 327 p.
7. *Zadionchenko V.S., Adasheva T.V., Sandomirskaya A.P.* Endothelium dysfunction and arterial hypertension: therapeutic possibility// *Rossiyskiy Meditsinskiy Zhurnal*.– 2002.– Vol. 10, N1.– P. 11–15.
8. *Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakharia E.A., Zapadnyuk B.V.* Laboratory animals.– Kiev: Vyscha shkola, 1983.– 252 p.
9. *Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G.* Catalase activity examining method // *Lab. Delo*.– 1988.– N1.– P. 16–19.
10. *Mironov N.V., Mikhin V.P., Chernyatina M.L.* Some cardiocytocproteins efficiency of patients with arterial hypertension complicated by acute ischemia stroke// *Effektivnaya Farmakoterapiya*.– 2008.– N2.– P. 18–23.
11. *Cytoprotecting agent "Mexicor®" application in complex therapy of patients with acute and chronic disorder forms of brain blood circulation: Methodical manual* / Ed. by M.A. Borodina. 2008.– 29 p.
12. *Putilina F.E.* Content determination of glutathione reduction in tissues // *Metody. biokhim. issled.* / Ed. by M.I. Porokhovoy.– Leningrad: Leningrad Institute Publishing House, 1982.– P. 183–185.
13. *Stolyarova V.V.* Cardioprotective preparation effect study with antioxidant activity for acute brain ischemia // *Eksp. i klin. farmakologiya*.– 2001.– Vol. 64, N6.– P. 31–33.
14. *Suslina Z.A., Fedorova T.N., Maksimova M.Yu. et al.* Antioxidant therapy of ischemic stroke // *Zh. Neurol. Psikiatr.*– 2000.– Vol. 100, N10.– P. 34–39.
15. *Chernov N.N.* Glutathione study research in rat's liver. Growth enzymology.– Moscow: Peoples' Friendship University of Russia, 1979.– P. 96–101.
16. *Fedorova T.N.* Lipid peroxidation of brain ischemia and possibilities of its correction: Author's abstract of thesis of cand.biol.sci.– Moscow, 1995.– 19 p.
17. *Han D., Trischler H.J., Packer L.* Alpha-lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte jurkat cell line // *Biochem. Biophys. Res.*– 1995.– Vol. 207, N1.– P. 258–264.
18. *Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // *J. Biol. Chem.*– 1949.– Vol. 177, N2.– P. 751–766.
19. *Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E. et al.* Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // *Science*.– 1973.– Vol. 179, N73.– P. 588–590.

коррекции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– М., 1995.– 19 с.

17. *Han D., Trischler H.J., Packer L.* Alpha-lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte jurkat cell line // *Biochem. Biophys. Res.*– 1995.– Vol. 207, N1.– P. 258–264.
18. *Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // *J. Biol. Chem.*– 1949.– Vol. 177, N2.– P. 751–766.
19. *Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E. et al.* Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // *Science.*– 1973.– Vol. 179, N73.– P. 588–590.
20. *Rudack D., Chisholm E.M., Holten D.* Rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase // *J. Biol. Chem.*– 1971.– Vol. 246, N5.– P. 1249–1254.

Accepted in 05.07.2010

*Поступила 05.07.2010
Рецензент Н.А. Волкова*