

УДК 610:591.481.1:67.09.45:599.325.1:616-092.4

© Ю.Ю. Шимкус, Е.В. Грекова, Е.К. Яковчук, 2014.

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА В РЕЗУЛЬТАТЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДОНЕПЕЗИЛА И БЕТАГИСТИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ДЕЙСТВИЯ ОБЩЕЙ ШИРОКОПОЛОСНОЙ ВИБРАЦИИ

Ю.Ю. Шимкус, Е.В. Грекова, Е.К. Яковчук

*Кафедра фармакологии (зав. кафедрой – проф. И.Д. Сапегин), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинской университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь*

### MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE TISSUES OF THE BRAIN AS A RESULT OF THE ANTIHYPOXIC EFFECT OF DONEPEZIL AND BETAGISTIN IN CASE OF MODELING OF WHOLE BODY WIDE-FREQUENCY VIBRATION

Y.Y.Shimkus, E.V.Grekova, E.K. Yakovchuk

#### SUMMARY

In chronic experiments on conscious rabbits with implanted in the cerebral cortex, thalamus and hypothalamus needle platinum electrodes oxygen tension in the tissues of these structures was measured by polarographic in modeling general wide-frequency vibration without the use of drugs, as well as with application of the central anticholinesterase drug donepezil (1mg/kg intravenously) and betahistine (2 mg / kg). In acute experiments after 8 hours of vibration rabbits were decapitated. Histological sections were stained with haematoxylin and eosin and toluidine blue and examined by Nissl under an electron microscope. Donepezil several times reduces falling  $pO_2$  in the cerebral cortex and hypothalamus, and completely eliminated the variation of the thalamus. Betahistine let  $pO_2$  decrease in the cortex and caused an increase in oxygen tension in the subcortical structures (30%). Betahistine better than donepezil reduces spasm of arterioles.

### МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В ТКАНИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В РЕЗУЛЬТАТІ АНТИГИПОКСИЧНОГО ЕФЕКТУ ДОНЕПЕЗИЛУ І БЕТАГІСТИНУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ДІЇ ЗАГАЛЬНОЇ ШИРОКОСМУГОВОЇ ВІБРАЦІЇ

Ю.Ю. Шимкус, Е.В. Грекова, Е.К. Яковчук

#### РЕЗЮМЕ

В хронічних експериментах на ненаркотизованих кроликах із імплантованими в кору великих півкуль, таламус і гіпоталамус голчастими платиновими електродами методом полярографії вимірювали напругу кисню в тканинах зазначених структур при моделюванні загальної широкосмугової вібрації без застосування препаратів, а також на тлі центрального антихолінестеразного засобу донепезилу (1 мг/кг внутрішньовенно) і бетагістину (2 мг / кг). У гострих експериментах після 8-годинної дії вібрації, кроликів забивали шляхом декапітації. Гістологічні зрізи фарбували гематоксилін - еозином і толуїдиновим синім по Ніслю і досліджували під електронним мікроскопом. Донепезил в півтора разу зменшував падіння  $pO_2$  в корі великих півкуль і гіпоталамусі і повністю усував зміни показника в таламусі. Бетагістин перешкоджав зниженню  $pO_2$  в корі і викликав зростання напруги кисню в підкіркових структурах на 30%. Таким чином, бетагістин краще донепезилу зменшує спазм артеріол.

**Ключевые слова:** донепезил, бетагистин, вибрация, напряжение кислорода.

Вибрационная болезнь занимает ведущее место в структуре профессиональной заболеваемости [2, 3]. Вибрационная болезнь составляет, по данным разных авторов, от 13 до 15% в структуре профессиональных заболеваний. Количество больных вибрационной болезнью не имеет тенденции к уменьшению, что обусловлено все большей распространенностью источников вибрации, а технические средства виброзащиты достаточно дороги и не всегда эффективны. К действию вибрации невозможна адаптация, и поэтому она требует фармакологической профилактики и коррекции [7, 3]. Ранее на на-

шей кафедре выявлены гистологические изменения в тканях под действием 8-часовой общей широкополосной вибрации (ОШВ) в виде спазма сосудов, периваскулярного и небольшого перичеллюлярного отека. Наблюдалась умеренно выраженные гидрорические изменения клеток со смещением ядер к периферии, утолщением и укорочением отростков. При окраске по Нислю отмечена потеря хроматофильной субстанции с образованием клеток-теней. Имелся глиоз, нейронофагия [8]. Эти данные послужили предпосылкой для наших исследований.

В результате действия общей вибрации возни-

кают нарушения мозгового кровообращения и его регуляции в виде церебрального ангиодистонического синдрома [9], которые приобретают характер стойкого спазма сосудов. Исследования нашей кафедры показали, что общая широкополосная вибрация (ОШВ) вызывает замедление мозгового кровотока и вестибулярные расстройства, рост биоэлектрической активности мозга [10], окислительного метаболизма, гипоксии, ацидоза, активации перекисного окисления липидов, отеочно-дистрофическим изменениям в тканях [2, 9, 7].

В качестве первого исследуемого препарата нами выбрано центральное антихолинэстеразное средство донепезил, способный ослаблять воспалительные процессы, усиливать перфузию мозга, оказывая вазодилатирующий эффект на сосуды головного мозга и гиппокампа [10]. Улучшение межнейронной передачи под действием донепезила обусловлено усилением и удлинением действия ацетилхолина [9]. Выявлено влияние холинергической системы на активность глутаматергической системы [10], что позволяет говорить о церебропротективном действии центральных антихолинэстеразных средств.

Бетагистин является ингибитором диаминоксидазы – фермента, инактивирующего гистамин. Этот препарат является слабым агонистом  $H_1$ -рецепторов и мощным антагонистом  $H_3$ -рецепторов внутреннего уха и вестибулярных ядер ЦНС. Бетагистин увеличивает синтез гистамина и его высвобождение в туберомамиллярном ядре заднего гипоталамуса. Влияние гистамина на вестибулярные клетки вносит вклад в перестройку нейрональной активности [8].

Целью данного исследования является изучение морфологических изменений в тканях головного мозга в результате антигипоксического эффекта бетагистина и донепезила, вызванных действием общей широкополосной вибрации.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проведены на ненаркотизированных кроликах породы шиншилла. Проведено 58 опытов на 24 кроликах, в том числе хронические эксперименты на 16, острые - на 8. Максимальная продолжительность жизни кроликов с вживленными электродами может достигать 2 и более лет. Поэтому одних и тех же животных последовательно с промежутком не менее чем в 3 дня использовали в хронических экспериментах. Количество наблюдений во всех сериях патоморфологических исследований составляло 2. Исследования проводились в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по поводу гуманизации работы с лабораторными животными, которые отражены в «Европейской конференции по защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1985). ОШВ воспроизводили с помощью сконструированного в нашей лаборатории специаль-

ного стенда. Динамику  $pO_2$  в тканях мозга изучали методом полярографии [5, 7] с помощью вживленных в кору, таламус и гипоталамус игольчатых платиновых электродов, на которые подавали потенциал  $-0.6$  V по отношению к общему референтному хлор-серебряному электроду, расположенному на ухе кролика. Изменения силы тока в цепи, пропорциональные изменению  $pO_2$  в тканях, прилежащих к оголенной части платинового электрода, усиливали и регистрировали с помощью нановольтамперметров Р341 и физиоблока «Пульс - 01». Во всех опытах предварительно регистрировали исходные показатели, затем в краевую вену уха кролика исследуемые препараты из расчета: донепезил - 0.1 мл/кг (препарат «Альмер» фирмы «Актавис») и бетагистин - 2 мг/кг («Вестибо» фирмы «Actavis») и сразу после этого начинали воздействия ОШВ. Показатели  $pO_2$  определяли в течение 2 часов: на 30, 60, 90 и 70 минутах соответственно. Полученные данные без вычисления абсолютных значений  $pO_2$  непосредственно переводили в % к исходному уровню, принятому за 100%. Статистическую обработку вычисленных показателей осуществляли с использованием критерия Стьюдента в среде электронных таблиц Lotus73.

Для получения информации об особенностях изменений в сосудах, нейронах и глии, мы использовали гистологические методы. Сразу после прекращения 8-часового воздействия животных забивали путем декапитации. Препараты мозга фиксировали в 4% растворе формалина. Кусочки, содержащие исследуемые структуры (пре- и постцентральная извилина, а также височная доля коры больших полушарий, таламус, гипоталамус, мозжечок), после обезжирования, обезжиривания, удаления остатков фиксатора и уплотнения заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы, приготовленные на микротоме МС-2 толщиной до 10 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином и толуидиновым синим по Нисслю. Срезы исследовали и фотографировали на цифровом световом микроскопе фирмы Olympus. Выполнено 4 серии срезов: 1) контрольные; 2) на фоне ОШВ без применения препаратов; 3) при ОШВ на фоне действия донепезила; 4) при ОШВ на фоне действия бетагистина.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ОШВ без применения препаратов вызывала достоверное уменьшение напряжения кислорода ( $pO_2$ ) в коре больших полушарий и, в меньшей степени - в гипоталамусе с максимумом на 90-й минуте наблюдения. В то же время на 70-й минуте отмечено частичное возвращение показателя к исходным значениям. В таламусе, наоборот, отмечена тенденция к абсолютному росту  $pO_2$ , вызванная перераспределением крови (табл.1). Антигипоксическое действие донепезила преобладало в коре больших полушарий, бетагистина - в подкорковых структурах. Донепезил в

полтора раза уменьшал падение  $pO_2$  в коре больших полушарий и гипоталамусе и полностью устранял изменения показателя в таламусе. Бетагистин пре-

пятствовал снижению  $pO_2$  в коре и вызывал абсолютный рост напряжения кислорода в подкорковых структурах.

Таблица 1

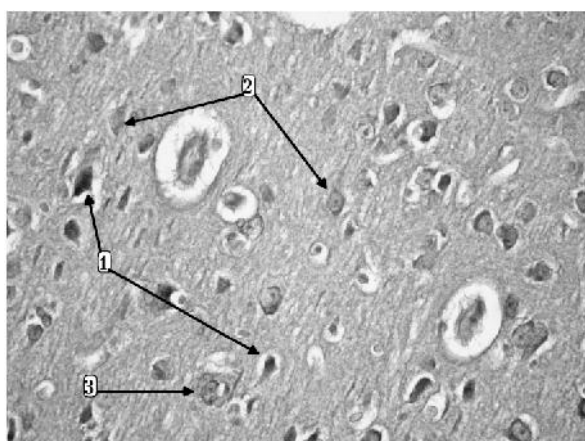
Динамика напряжения кислорода ( $pO_2$ ) в тканях мозга бодрствующих кроликов при общей широкополосной вибрации (ОШВ)

Структуры	n	Показатели	Изменения показателя в $\pm\%$ к исходному уровню, принятому за 100%			
			30 минут	60 минут	90 минут	70 минут
<b>ОШВ без применения препаратов</b>						
Кора	8	M	-10,85	-10,78	-28,69	-34,33
		m	1,48	1,28	3,22	3,34
		p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Таламус	8	M	-0,17	1,96	3,54	6,7
		m	0,75	1,74	2,49	3,23
		p	>0,5	>0,05	>0,25	>0,1
Гипоталамус	8	M	-3,82	-10,27	-17,5	-22,96
		m	1,18	1,95	3,04	4,05
		p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b>ОШВ + бетагистин</b>						
Кора	7	M	-2,49	-6,87	-7,41	-8,6
		m	0,69	0,55	0,93	1,29
		p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Таламус	10	M	3,21	7,45	2,08	0,84
		m	1,07	1,52	0,79	1,16
		p	<0,05	<0,01	<0,05	>0,5
Гипоталамус	9	M	1,75	3,7	0,86	4,61
		m	0,49	1,02	0,89	0,97
		p	<0,01	<0,01	>0,5	<0,01
<b>ОШВ + донепезил</b>						
Кора	10	M	-3,94	-3,41	-3,92	-2,05
		m	0,61	0,77	0,77	0,75
		p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05
Таламус	9	M	-1,03	0,36	0,23	-1,04
		m	0,85	1,04	1,56	1,8
		p	>0,25	>0,5	>0,5	>0,5
Гипоталамус	10	M	-1,2	-2,94	-2,1	-1,83
		m	0,81	0,58	0,96	0,67
		p	>0,25	<0,01	>0,1	<0,05

ОШВ без применения препаратов вызывает отёчно-дистрофические изменения в тканях мозга: набухание вещества мозга, пери- и интрацеллюлярный отёк, выявляемые при окрашивании гематоксилин-эозином. Данные изменения выражены в различной степени в зависимости от исследуемой структуры мозга. При окрашивании по Нисслю вы-

является выраженная анизохромия. В исследуемых структурах преобладают нормохромные нейроны со средне- и крупноглыбчатым хроматофильным веществом и четким ядром (рис. 2, 3). Также часто обнаруживались гипохромные нейроны и полностью потерявшие окраску – «клетки тени» (рис. 1). Это вызвано распадом нуклеопротеидов, непосред-

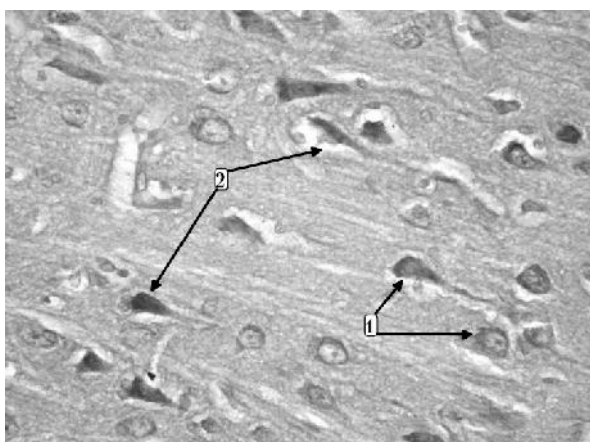
ственным действием виброускорений на молекулы ферментов и нуклеопротеидов, ретроградной дегенерацией в результате повреждения миелиновой оболочки. По сравнению с донепезилом, на фоне действия бетагистина, изменения в венах, вызванные ОШВ без применения препаратов, устраняются лучше. Отёк вокруг них исчезает практически полностью, просвет не расширен [9]. Для всех уровней сосудистого русла, особенно для артериол, характерно утолщение сосудистой стенки, преимущественно за счёт набухания эндотелия с увеличением ядер. Местами встречаются петехиальные кровоизлияния в околососудистое пространство [6].



**Рис. 1.** Кора больших полушарий – прецентральная извилина, ОШВ без применения препаратов. Окраска – по Ниссля. Линейка 100 мкм. 1- гиперхромные нейроны; 2 – гипохромные «клетки-тени»; 3 – нейронофагия.

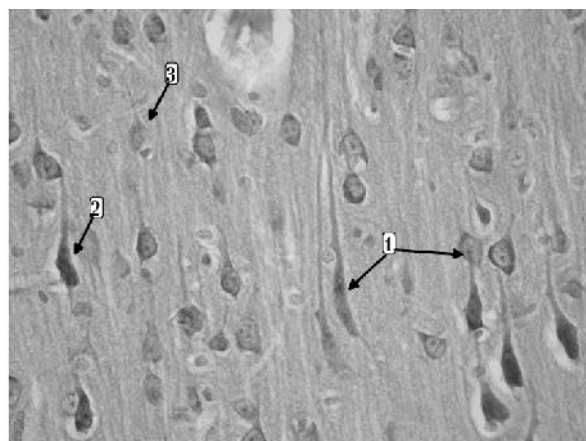
ми [6, 7].

Причиной преимущества бетагистина по действию на сосудистый тонус следует считать более широкий спектр действия. Так, донепезил, способствуя выделению ацетилхолина в синаптическую



**Рис. 3.** Кора больших полушарий – прецентральная извилина, ОШВ + бетагистин. Окраска – по Ниссля. Линейка 100 мкм. 1- нормохромные нейроны; 2 – гиперхромные нейроны.

Сосудорасширяющий эффект бетагистина более выражен и проявляется преимущественно на уровне мелких артериол. Механизм антигипоксического действия донепезила связан с улучшением кровоснабжения [7]. Как следствие, увеличивается  $pO_2$  в тканях, улучшается энергообеспечение мышечного сокращения и восстанавливается вазоконстрикторная активность, вызванная стимуляцией выделения ацетилхолина, уменьшением гиперактивности нейронов и потребления ими кислорода в результате вестибулопротективного эффекта [10]. Бетагистин лучше донепезила уменьшает спазм артериол, которые в обоих случаях остаются суженны-



**Рис.2.** Кора больших полушарий – прецентральная извилина, ОШВ + донепезил. Окраска – по Ниссля. Линейка 100 мкм. 1- нормохромные нейроны; 2 – гиперхромные нейроны; 3 – гипохромные нейроны.

цель в парасимпатических нервах ведет к росту выделения окиси азота (NO) и расширению сосудов.

В то же время бетагистин не только оказывает аналогичный эффект за счёт пресинаптического усиления высвобождения ацетилхолина, но и имеет дополнительные механизмы сосудорасширяющего действия путем возбуждения  $H_1$ - и  $H_2$ - рецепторов сосудов.

#### ВЫВОДЫ

1. Общая широкополосная вибрация вызывает падение напряжения кислорода в тканях.

2. Оба исследованных нами препарата проявили выраженное антигипоксическое действие, более выраженное в подкорковых структурах. Причем защитное действие бетагистина было сильнее. Это подтверждается уменьшением снижения или полной нормализацией напряжения кислорода в тканях по данным полярографии. Кроме того, по данным гистологических исследований, об этом свидетельствуют восстановление окраски тигроидного вещества по Ниссля, а также уменьшение ответной глиальной реакции.

3. Показана эффективность обоих препаратов в отношении возникающих нарушений со значительным преимуществом бетагистина, что объясняется более широким спектром его действия. Однако ни донепезил ни бетагистин не могут рассматриваться как средства монотерапии вследствие ограниченного спектра действия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белякова А. Г. Протекторное действие контрикала при нарушениях кровоснабжения и кислородного баланса мозга, вызванных действием общей широкополосной вибрации / А.Г. Белякова, И.Д. Сапегин // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения: Труды Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского, 2008. – Т.94, Ч.III – С. 7-6.

2. Мельникова Е.В. Многофакторная нейропротекция при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения: Автореферат диссертации доктора медицинских наук: 9.00.13 / Е.В. Мельникова. – Санкт-Петербург, 2007. – С.39.

3. Сапегин И.Д. Фармакологическая профилактика цереброваскулярных нарушений при комбинированном действии общей вибрации и укачивания: Автореферат диссертации доктора медицинских наук: 9.03.05 / И.Д. Сапегин – Киев, 2003. – С. 39.

4. Сапегин И. Д. Влияние общей широкополосной вибрации на кровообращение, напряжение кислорода и водно-электролитный баланс в тканях мозга бодрствующих кроликов / И.Д. Сапегин // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-

биологических наук и практического здравоохранения: Труды Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского, 2004. – Т.35, Ч.1. – С. 264 – 271.

5. Шимкус Ю.Ю. Влияние донепезила на мозговое кровообращение и кислородный баланс мозга при моделировании действия общей вибрации / Ю.Ю. Шимкус, И.Д. Сапегин // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. - № 4. – С. 383 – 388.

6. Шимкус Ю.Ю. Влияние бетагистина на мозговое кровообращение и кислородный баланс мозга при моделировании действия общей вибрации / Ю.Ю. Шимкус, И.Д. Сапегин // Медичні перспективи. – 2012. - Т.17, № 4. – С. 29 – 33.

7. Akaike A. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of  $\alpha 4$ - and  $\alpha 7$ -receptors in neuroprotection / A. Akaike, Y. Takada-Takatori, T. Kume, Y. Izumi // J. Mol. Neurosci. – 2010. – V. 40, № 1-2. – P. 26-216.

8. Fernandez de Sevilla D. Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons/ D. Fernandez de Sevilla, A. Ndcz, M. Borde, R. Malinow, W. BuCo // J. Neurosci. – 2008. – №28. – P.969-978.

9. Imamura K. The effect of donepezil on increased regional cerebral blood flow in the posterior cingulate cortex of a patient with Parkinson's disease dementia/ K. Imamura, K. Wada-Isoe, H. Kowa, Y. Tanabe, K. Nakashima // Neurocase. – 2008. – V.9, №3. – P.271-275.

10. Ayala G. Vibrational spectra and structure of myelin membranes / G. Ayala, P. Carmona, M. de Cozar, J. Monreal // Eur. Biophys. J. – 1987. – V.14, №4. – P.219-225.