

УДК 616-035.1. 616-092.9. 616-018
DOI: 10.20310/1810-0198-2017-22-6-1712-1716

ВЛИЯНИЕ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА НА НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПРОГЕСТЕРОНА У КРЫС С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

© О.В. Волкович¹⁾, Г.А. Захаров²⁾, Г.И. Горохова³⁾, Е.Б. Горшенева²⁾

¹⁾ Чуйская областная объединенная больница

720051, Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. Саратовская, 10/2
E-mail: volkovich_oleg@mail.ru

²⁾ Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина
392000, Российская Федерация, г. Тамбов, ул. Интернациональная, 33
E-mail: gaz41@mail.ru, gorsheneva.k@mail.ru

³⁾ Кыргызско-Российский Славянский университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина
720000, Кыргызская Республика, г. Бишкек, ул. Киевская, 44
E-mail: gaz41@mail.ru

Установлено, что применение прогестерона при черепно-мозговой травме повышает выживаемость крыс, их неврологический статус, физическую работоспособность и снижает уровень стресса. Этот эффект более выражен при назначении препарата с учетом его циркадианного ритма.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; нейропротекция; прогестерон; циркадианный ритм

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является значимой медицинской и социальной проблемой. Для лечения ее последствий продолжается поиск лекарственных веществ, обладающих нейропротекторными свойствами. С этой целью было обращено внимание на этот эффект гормона прогестерона. Ранее его значение сводилось исключительно к роли женского полового гормона, являющегося одним из основных гормонов репродуктивной и эндокринной системы. В настоящее время прогестерон и его метаболиты принято классифицировать как нейростероиды [1]. Накоплен значительный экспериментальный материал, демонстрирующий нейропротекторную активность прогестерона при ишемии головного мозга, и выявлены механизмы его действия [2–3].

Продолжает оставаться повышенный интерес к изучению ритмических функций в организме как в условиях нормы, так и патологии [4]. Особое значение имеет не только наличие циркадианной организации физиологических функций, но и хронофармакологические аспекты действия лекарств [5]. Показаны временные изменения в кинетике многих лекарственных средств, что имеет большое практическое значение [6].

Была установлена циркадианная флюктуация уровня прогестерона в крови животных и человека в норме [7]. Показано, что акрофаза наблюдается в ночные часы (с 22 до 2 ч по данным различных авторов), а надир приходится на утро (в 8 ч). Было высказано предположение, что при соблюдении естественного циркадианного ритма содержания прогестерона в крови при его применении нейропротекторная активность может быть более выражена. В то же время при тяжелой ЧМТ возможно развитие дисинхроноза, что может приводить к нивелированию хронофармакодинамических эффектов прогестерона.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось сопоставление нейропротекторного эффекта прогестерона у крыс с ЧМТ при назначении его с учетом его естественного циркадианного ритма и без его учета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 32 половозрелых крысах-самцах, массой 220–270 г, содержащихся в условиях вивария. Моделирование ЧМТ проводилось с помощью weight-drop метода нанесением удара грузом (70 г) с высоты 85 см, в центр теменной области черепа, при помощи специального устройства. Энергия воздействия в этом случае составила 0,6 Дж [8].

Животных разделили на 4 группы: I группа – интактная, II – контрольная с ЧМТ с последующим введением плацебо, III группа – крысы с аналогичной травмой и лечением прогестероном в суточной дозе 30 мг/кг: утром 15 мг/кг и вечером 15 мг/кг и IV – с ЧМТ и лечением прогестероном в той же суточной дозе (30 мг/кг) с учетом его естественного циркадного ритма по схеме: утром 25 мг/кг и вечером 5 мг/кг. Терапию начинали через 30 мин после травмы. Прогестерон вводили интраперитонеально в начале в дозе 30 мг/кг массы тела, а затем в течение первых 3 суток в дозе 30 мг/кг/сутки, согласно схеме опыта. Животным контрольной группы вместо прогестерона вводили эквивалентное количество 0,9 % раствора хлорида натрия.

Оценивалась выживаемость крыс – регистрировали гибель животных в течение 15 суток после травмы. В случае гибели крысы в эксперимент вводилось новое животное. Неврологический статус анализировали используя соматосенсорный тест и тяжесть неврологического дефицита по шкале Neurological Severity Scores

(NSS) [9–10]. Оценка ориентировочно-исследовательского поведения осуществлялась в тесте открытого поля [11]. С этой целью изучалось заглядывание крыс в норки в полу arenas. Исследовательскую активность животного принято считать чувствительным показателем уровня стрессированности, когда количество заглядываний в норки обратно пропорционально уровню стресса [12]. Пробу на физическую работоспособность крыс (поднятие груза) проводили по методике С.В. Сперинского [11].

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы SPSS13. Вычисляли среднее значение (M) и ошибку средней величины (m). Разницу средних величин оценивали по критерию Стьюдента и вероятности P , которую признавали статистически значимой при $P < 0,05$. Соответствие полученных данных нормальному распределению оценено с помощью критерия согласия Колмогорова–Смирнова, результаты которого показали, что отклонение от нормального распределения не существенно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что на 15 сутки эксперимента летальность в опытных группах была высокой. Так, во II группе она составила 44,4 %, в III – 37,5 % и в IV – 28,6 %. У выживших животных различий между опытными группами в 1 сутки после воздействия выявлено не было. Неврологический статус животных во всех опытных группах значимо не отличался, составляя во II, III и IV группах $9,6 \pm 0,5$, $9,4 \pm 0,5$ и $9,8 \pm 0,4$ баллов соответственно (табл. 1).

Работоспособность на 1 сутки во II, III и IV группах составила $264 \pm 30,2$, $247 \pm 25,4$ и $250 \pm 28,3$ г и была значительно снижена по сравнению с исходной (555 ± 46 г) (табл. 2). Соматосенсорный тест составил во II, III и IV группах $104 \pm 6,6$, $107 \pm 5,7$ и $102 \pm 7,8$ с, соответственно, и был значительно удлинен по сравнению с интактными животными (табл. 3). Поведение грызунов, оцененное в тесте «открытое поле», в 1 сутки после

травмы значительно изменилось (табл. 4). Заглядывание в норки в полу arenas снизилось и составило во II, III и IV группах 0 ± 0 , $0,2 \pm 0,2$ и $0,2 \pm 0,2$. В интактной группе животных этот показатель составлял $1,6 \pm 0,2$. Значимых различий между опытными группами не выявлено.

На 7 сутки наблюдения состояние крыс в опытных группах несколько улучшилось. При оценке неврологического статуса по шкале NSS отмечена значимая разница между II группой ($9,2 \pm 0,4$ балла), не получавшей прогестерон, и III группой ($6,8 \pm 0,7$ баллов), получавшей препарат 2 раза в сутки в дозе 15 мг/кг ($P < 0,05$). Между II и IV группами выявлена более значимая разница ($P < 0,01$). В III и IV группе отмечается улучшение состояния по сравнению с I сутками. Между опытными группами, получавших прогестерон по разным схемам, достоверных различий не выявлено. Отмечается только тенденция к уменьшению баллов по шкале NSS: в IV группе по сравнению с III (табл. 1). В то же время работоспособность во II, III и IV группах составила $285 \pm 40,1$, $401 \pm 26,8$ и 406 ± 11 г соответственно (табл. 2). То есть выявлена значимая разница между II и III и между II и IV группами ($P < 0,05$). Между опытными группами, получавших прогестерон по разным схемам, достоверных различий не выявлено ($P > 0,5$). Отмечено достоверное повышение работоспособности во II и III группах на 7 сутки, по сравнению с 1. На 7 сутки время выполнения соматосенсорного теста во II группе увеличилось до $113 \pm 6,1$ с, а в группах, получавших прогестерон, снизилось: во II группе до $86 \pm 5,2$ с и в III до $75 \pm 5,8$ с (табл. 3). Выявлена статистически значимая разница между II и III и между II и IV группами ($P < 0,01$). А между III и IV группами статистически значимой разницы не выявлено. В III и IV группах отмечается положительная динамика по сравнению с 1 сутками (табл. 3). Оценка ориентировочно-исследовательского поведения на 7 сутки выявила наличие значимой разницы в количестве заглядываний в норки между II и III и II и IV ($P < 0,01$) группами (табл. 4). И видна положительная динамика в IV группе по сравнению с 1 сутками.

Таблица 1

Неврологический статус по шкале NSS ($M \pm m$), баллы

Группы	Число крыс	До ЧМТ	1 сутки	7 сутки	15 сутки
I	3	0	0	0	0
II	5		$9,6 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,4$	$8,6 \pm 0,5$
III	5		$9,4 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,7^{*+}$	$4,6 \pm 0,5^{***++}$
IV	5		$9,8 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,4^{**++}$	$2,8 \pm 0,4^{***++}$

Примечание: здесь и в табл. 2, 3, 4 * – статистически значимое различие величин контрольной (II) и опытных (III и IV) групп; + – статистически значимое различие величин внутри каждой группы в динамике по сравнению с 1 сутками после травмы (* и + – $P < 0,05$; ** и ++ – $P < 0,01$).

Таблица 2

Работоспособность (статическая сила) крыс ($M \pm m$), г

Группы	Число крыс	До ЧМТ	1 сутки	7 сутки	15 сутки
I	3	555 ± 46	0	0	0
II	5		$264 \pm 30,2$	$285 \pm 40,1$	$318 \pm 27,6$
III	5		$247 \pm 25,4$	$401 \pm 26,8^{***++}$	$434 \pm 20,9^{***++}$
IV	5		$250 \pm 28,3$	$406 \pm 11,9^{***++}$	$503 \pm 7,3^{***++}$

Таблица 3

Соматосенсорный тест ($M \pm m$), с

Группы	Число крыс	До ЧМТ	1 сутки	7 сутки	15 сутки
I	3	7 ± 0,4	6,7 ± 0,9	6,7 ± 0,3	5,7 ± 0,3
II	5		104 ± 6,6	113 ± 6,1	98 ± 5,4
III	5		107 ± 5,7	86 ± 5,2**+	53 ± 3,3**++
IV	5		102 ± 7,8	75 ± 5,8**+	39 ± 2,1**++

Таблица 4

Заглядывание в норки в тесте «открытое поле» ($M \pm m$), количество

Группы	Число крыс	До ЧМТ	1 сутки	7 сутки	15 сутки
I	3	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2
II	5		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
III	5		0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,2**	0,6 ± 0,2**
IV	5		0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,2**+	1,4 ± 0,2**++

Таким образом, на седьмые сутки в группах животных, получавших прогестерон, положительная динамика выражена более значительно по сравнению с животными, не получавшими лечение. Необходимо отметить увеличение времени выполнения соматосенсорного теста на седьмые сутки, по сравнению с первыми, в контрольной группе, не получавшей прогестерон, и значимое снижение этого времени в группах, его получавших.

На пятнадцатые сутки после травмы неврологический статус по шкале NSS в контрольной группе составил $8,6 \pm 0,5$ балла (табл. 1). В группах животных, получавших прогестерон, – значимо меньше: в III – $4,6 \pm 0,5$ балла и в IV $2,8 \pm 0,4$. Выявлена статистически значимая разница между II и III и между II и IV группами ($P < 0,01$). Кроме того, установлено достоверное различие ($P < 0,05$) по шкале NSS между группами животных, получавшими в посттравматическом периоде прогестерон в одинаковых дозах, но по различным схемам. С большим эффектом в группе, где учитывался циркадианный ритм (табл. 1). Работоспособность животных на 15 сутки после травмы, по сравнению с предыдущими сроками, повысилась, составляя во II, III и IV группах $318 \pm 27,6$, $434 \pm 20,9$ и $503 \pm 7,3$ г соответственно (табл. 2). Наблюдается значимая разница между II и III и между II и IV группами ($P < 0,01$). Между опытными группами, получавшими прогестерон по разным схемам, выявлено также значимое различие в 69 г ($P < 0,01$). В обеих опытных группах работоспособность достоверно повысилась по сравнению с первыми сутками (табл. 2). В этот же срок результат соматосенсорного теста был равен во II, III и IV группах $98 \pm 5,4$, $53 \pm 3,3$ и $39 \pm 2,1$ с соответственно (табл. 3). Отмечено значимое различие между II (контрольной группой) и опытными – III и IV группами ($P < 0,01$). Следует отметить наличие различия ($P < 0,05$) между III и IV группами и достоверное улучшение показателей по сравнению с первыми сутками (табл. 3). На пятнадцатые сутки опыта ориентировочно-исследовательское поведение, оцененное по количеству заглядываний в норки, показало значимую разницу между контрольной (II) и опытными группами (III и IV): во II; III и IV группах количество заглядываний в норки было

0 ± 0 , $0,6 \pm 0,2$ и $1,4 \pm 0,2$ соответственно (табл. 4). Выявлено наличие статистически значимой разницы между группами, получавшими прогестерон по разным схемам ($P < 0,05$). Лучшие показатели в группе (IV), где учитывался циркадный ритм прогестерона.

Таким образом, эффективность и целесообразность назначения прогестерона с учетом его естественного биологического циркадианного ритма отчетливо проявляется к пятнадцатым суткам.

ВЫВОДЫ

1. Применение прогестерона в раннем периоде черепно-мозговой травмы у крыс позволяет повысить их выживаемость, неврологический статус, физическую работоспособность и снизить уровень стрессированности.

2. Нейропротекторный эффект прогестерона более выражен при его назначении с учетом естественного биологического циркадианного ритма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meffre D., Delespierre B., Gouzeou M., Leclerc P., Vinson G.P., Schumacher M. The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx is expressed in brain regions involved in water homeostasis and is up-regulated after traumatic brain injury // J. Neurochem. 2005. V. 93. P. 1314-1326.
2. Aggarwal R., Medhi B., Pathak A., Dhawan V., Chakrabarti A. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2008. V. 60. P. 731-737.
3. Vanlandingham J.W., Cekic M., Cutler S.M., Hoffman S.W., Washington E.R., Johnson S.J. Progesterone and its metabolite allopregnanolone differentially regulate hemostatic proteins after traumatic brain injury // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2008. V. 28. P. 1786-1794.
4. Cuzuda P.C. Особенности организации ритмостазы у подростков с различной адаптацией к учебным нагрузкам: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь: СГУ, 2004.
5. Bruguerolle B. Chronopharmacokinetics: current status // Clin. Pharmacokinet. 1998. V. 35. P. 83-94.
6. Warltier D.C. Chronobiology and anesthesia // Anesthesiology. 2004. V. 100 (2). P. 413-427.
7. Leibenluft E. Do gonadal steroids regulate circadian rhythms in humans? // J. Affect Disord. 1993. V. 29. P. 175-181.
8. Shapira Y., Lam A.M., Paez A., Artru A.A., Laohaprasit V., Donato T. The influence of acute and chronic alcohol treatment on brain edema, cerebral

- infarct volume and neurological outcome following experimental head trauma in rats // *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 1997. V. 9. P. 118-127.
9. Zhang L., Chen J., Li Y. Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats // *J. Neurol. Sci.* 2000. V. 174. P. 141-146.
 10. Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats // *Stroke.* 2001. V. 32. P. 1005-1011.
 11. Буреи Я., Буриова О., Хьюстон Дж. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высш. шк., 1991. 399 с.
 12. Калев А.В. Стресс. Тревожность. Поведение. Киев: Энигма, 1998. 98 с.

Поступила в редакцию 26 июня 2017 г.

Волкович Олег Викторович, Чуйская областная объединенная больница, г. Бишкек, Кыргызская Республика, кандидат медицинских наук, врач, e-mail: volkovich_oleg@mail.ru

Захаров Геннадий Алексеевич, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, г. Тамбов, Российская Федерация, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологии, e-mail: gaz41@mail.ru

Горохова Галина Ивановна, Кыргызско-Российский Славянский университет, г. Бишкек, Кыргызская Республика, кандидат биологических наук, ст. научный сотрудник кафедры нормальной и патологической физиологии, e-mail: gaz41@mail.ru

Горшенева Екатерина Борисовна, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, г. Тамбов, Российская Федерация, кандидат биологических наук, ст. преподаватель кафедры патологии, e-mail: gosheneva.k@mail.ru

UDC 616-035.1. 616-092.9. 616-018
DOI: 10.20310/1810-0198-2017-22-6-1712-1716

THE INFLUENCE OF CIRCADIAN RHYTHM ON THE NEUROPROTECTION EFFECT PROGESTERONE OF RATS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY

O.V. Volkovich¹, G.A. Zakharov², G.I. Gorokhova³, E.B. Gorsheneva²

¹ Chuy Regional Combined Hospital

10/2 Saratovskaya St., Bishkek, Kyrgyz Republic, 720051

E-mail: volkovich_oleg@mail.ru

² Tambov State University named after G.R. Derzhavin

33 Internatsionalnaya St., Tambov, Russian Federation, 392000

E-mail: gaz41@mail.ru, gosheneva.k@mail.ru

³ Kyrgyz Russian Slavic University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin

44 Kievskaya St., Bishkek, Kyrgyz Republic, 720000

E-mail: gaz41@mail.ru

It was established that the usage of progesterone of the traumatic brain injury can improve the survival rate of rats, its neurological status, improve physical performance and reduce stress level. This effect is more pronounced during the drugs prescribing by taking into account its circadian rhythm.

Keywords: traumatic brain injury; neuroprotection; progesterone; circadian rhythm

REFERENCES

1. Meffre D., Delespierre B., Guezou M., Leclerc P., Vinson G.P., Schumacher M. The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx is expressed in brain regions involved in water homeostasis and is up-regulated after traumatic brain injury. *J. Neurochem.*, 2005, vol. 93, pp. 1314-1326.
2. Aggarwal R., Medhi B., Pathak A., Dhawan V., Chakrabarti A. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2008, vol. 60, pp. 731-737.
3. Vanlandingham J.W., Cecik M., Cutler S.M., Hoffman S.W., Washington E.R., Johnson S.J. Progesterone and its metabolite allopregnanolone differentially regulate hemostatic proteins after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2008, vol. 28, pp. 1786-1794.
4. Sigida R.S. *Osobennosti organizatsii ritmostaza u podrostkov s razlichnoy adaptatsiy k uchebnym nagruzkam: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk.* [Peculiarities of Rhythms among Teenagers with Different Adaptation to Academic Loads. Cand. biol. sci. diss. abstr.]. Stavropol', Stavropol State University, 2004. (In Russian).
5. Bruguerolle B. Chronopharmacokinetics: current status. *Clin. Pharmacokinet.*, 1998, vol. 35, pp. 83-94.
6. Warltier D.C. Chronobiology and anesthesia. *Anesthesiology*, 2004, vol. 100 (2), pp. 413-427.
7. Leibenluft E. Do gonadal steroids regulate circadian rhythms in humans? *J. Affect Disord.*, 1993, vol. 29, pp. 175-181.

8. Shapira Y., Lam A.M., Paez A, Artru A.A., Laohaprasit V., Donato T. The influence of acute and chronic alcohol treatment on brain edema, cerebral infarct volume and neurological outcome following experimental head trauma in rats. *J. Neurosurg. Anesthesiol.*, 1997, vol. 9, pp. 118-127.
9. Zhang L., Chen J., Li Y. Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Neurol. Sci.*, 2000, vol. 174, pp. 141-146.
10. Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2001, vol. 32, pp. 1005-1011.
11. Buresh Ya., Burshova O., Kh'yuston Dzh. *Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya* [Methods and Basic Experiments on Brain and Behaviour Study]. Moscow, Vysshaya shkola Publ, 1991. 399 p. (In Russian).
12. Kaluev A.V. *Stress. Trevozhnost'. Povedenie* [Stress. Anxiety. Behaviour]. Kiev, Enigma Publ., 1998, 98 p. (In Russian).

Received 26 June 2017

Volkovich Oleg Viktorovich, Chuy Regional Combined Hospital, Bishkek, Kyrgyz Republic, Candidate of Medicine, Doctor, e-mail: volkovich_oleg@mail.ru

Zakharov Gennadiy Alekseevich, Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov, Russian Federation, Doctor of Medicine, Professor of Pathology Department, e-mail: gaz41@mail.ru

Gorokhova Galina Ivanovna, Kyrgyz Russian Slavic University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Bishkek, Kyrgyz Republic, Candidate of Biology, Senior Research Worker of Normal and Pathological Physiology Department, e-mail: gaz41@mail.ru

Gorsheneva Ekaterina Borisovna, Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov, Russian Federation, Candidate of Biology, Senior Lecturer of Pathology Department, e-mail: gosheneva.k@mail.ru

Для цитирования: Волкович О.В., Захаров Г.А., Горохова Г.И., Горшечева Е.Б. Влияние циркадианного ритма на нейропротекторный эффект прогестерона у крыс с черепно-мозговой травмой // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. Тамбов, 2017. Т. 22. Вып. 6. С. 1712-1716. DOI: 10.20310/1810-0198-2017-22-6-1712-1716

For citation: Volkovich O.V., Zakharov G.A., Gorokhova G.I., Gorsheneva E.B. Vliyaniye tsirkadiannogo ritma na neyroprotektorny effekt progesterona u kryss s cherepno-mozgovoy travmoy [The influence of circadian rhythm on the neuroprotection effect progesterone of rats with traumatic brain injury]. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya Estestvennyye i tekhnicheskie nauki – Tambov University Reports. Series: Natural and Technical Sciences*, 2017, vol. 22, no. 6, pp. 1712-1716. DOI: 10.20310/1810-0198-2017-22-6-1712-1716 (In Russian, Abstr. in Engl.).