

Калачева А.Г.¹, Громова О.А.¹, Гришина Т.Р.¹, Богачева Т.Е.¹, Демидов В.И.¹, Торшин И.Ю.², Томилова И.К.¹

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт», Долгопрудный, Россия

¹153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; ²141700, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер., 9

Изучение эффектов магния оротата на модели первично-генерализованных судорог

Цель исследования — изучение противосудорожного и нейропротективного эффекта магния оротата на тиосемикарбазидной модели судорог у крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на 112 белых крысах-самцах массой 200 г, у которых моделировали тяжелые клонико-тонические судороги воздействием конвульсанта тиосемикарбазид. На фоне вызванных тиосемикарбазидом судорог оценивали противосудорожные эффекты препаратов: габапентина; комбинации габапентин + магния оротат; натрия вальпроата; комбинации натрия вальпроат + магния оротат; магния оротата. Сравнивали неврологический статус, характеристики судорог, выживаемость, массу тела, концентрации магния в плазме крови и в эритроцитах. После окончания эксперимента животных забивали и анализировали гистологические характеристики мозга и нервов.

Результаты. Установлено, что магния оротат уменьшал тяжесть и длительность судорог, вызванных тиосемикарбазидом, увеличивал выживаемость животных, потенцировал противосудорожное действие габапентина и вальпроата натрия. Данные нейрогистологического анализа показали, что использованная модель судорог приводила к ишемическому повреждению головного мозга.

Заключение. Сделан вывод, что магния оротат минимизировал уровень ишемического повреждения нейроцитов и способствовал восстановлению морфологии тканей мозга при воздействии тиосемикарбазид.

Ключевые слова: судороги; ишемия; нейропротекция; магния оротат; габапентин; вальпроат натрия; тиосемикарбазид.

Контакты: Ольга Алексеевна Громова; unesco.gromova@gmail.com

Для ссылки: Калачева АГ, Громова ОА, Гришина ТР и др. Изучение эффектов магния оротата на модели первично-генерализованных судорог. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2017;9(1):61–66.

Investigation of the effects of magnesium orotate in a model of primary generalized seizures
Kalacheva A.G.¹, Gromova O.A.¹, Grishina T.R.¹, Bogacheva T.E.¹, Demidov V.I.¹, Torshin I.Yu.², Tomilova I.K.¹

¹Ivanovo State Medical Academy, Ministry of Health of Russia, Ivanovo, Russia;

²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi, Moscow Region, Russia

¹8, Sheremetevsky Pr., Ivanovo 153000; ²9, Institutsky Lane, Dolgoprudnyi, Moscow Region 141700

Objective: to investigate the anticonvulsant and neuroprotective effects of magnesium orotate in a rat thiosemicarbazide model of seizures in rats.

Material and methods. The investigation was conducted in 112 male albino rats weighing 200 g, in which severe clonic-tonic seizures were simulated by the convulsant thiosemicarbazide. The anticonvulsant effects against of thiosemicarbazide-induced seizures were evaluated in the following drugs: gabapentin; a combination of gabapentin + magnesium orotate; sodium valproate; a combination of sodium valproate + magnesium orotate; and magnesium orotate. The neurological status, characteristics of seizures, survival rates, body weight, and plasma and red blood cell magnesium concentrations were compared. After completing the animal experiment, the animals were euthanized and the histological characteristics of their brains and nerves were analyzed.

Results. Magnesium orotate was ascertained to reduce the severity and duration of thiosemicarbazide-induced seizures, to increase animal survival rates, and to potentiate the anticonvulsant action of gabapentin and sodium valproate. The neurohistological findings showed that the used model of seizures led to ischemic brain damage.

Conclusion. It has been concluded that magnesium orotate minimized the level of ischemic damage to nerve cells and contributed to restoration of the morphology of brain tissues after thiosemicarbazide administration.

Keywords: seizures; ischemia; neuroprotection; magnesium orotate; gabapentin; sodium valproate; thiosemicarbazide.

Contact: Olga Alekseevna Gromova; unesco.gromova@gmail.com

For reference: Kalacheva AG, Gromova OA, Grishina TR, et al. Investigation of the effects of magnesium orotate in a model of primary generalized seizures. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika* = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. 2017;9(1):61–66.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2017-1-61-66>

Магний — эссенциальный элемент, участвующий в биохимических и физиологических реакциях, протекающих в организме, в частности в контроле активности нервной системы, нервно-мышечной передаче, энергетическом и электролитном обмене. Магний входит в состав основных нейроак-

тивных ферментов, таких как глутаминсинтетаза, играющая важную роль в регуляции процессов возбуждения-торможения в коре. При дефиците ионов магния электрическая возбудимость клеток повышается. В клинико-экспериментальных исследованиях отмечено снижение внутриклеточной концен-

трации магния в нейронах при психических и неврологических нарушениях, в том числе при эпилепсии [1, 2].

Цель исследования — изучение влияния магния оротата¹ на выраженность и тяжесть течения первично-генерализованных судорог у крыс, вызванных тиосемикарбазидом, а также противосудорожного и нейропротективного действия препаратов.

Материал и методы. Исследование проведено на 112 белых крысах-самцах массой 200 г. Животные были разделены на группы: 1-я группа (n=16) — интактный контроль; 2-я группа (n=16) — контроль с воспроизведением первично-генерализованных судорог; 3-я группа (n=16) — животные, получавшие магния оротат в дозе 0,3 г/кг внутривентрикулярно в течение 18 дней; 4-я группа (n=16) — животные, получавшие габапентин в дозе 300 мг/кг внутривентрикулярно за 90 мин до воспроизведения судорог; 5-я группа (n=16) — животные, получавшие магния оротат в дозе 0,3 г/кг внутривентрикулярно в течение 18 дней и габапентин в дозе 300 мг/кг внутривентрикулярно за 90 мин до воспроизведения судорог; 6-я группа (n=16) — животные, получавшие вальпроат натрия в дозе 50 мг/кг внутривентрикулярно в течение 4 дней до воспроизведения судорог; 7-я группа (n=16) — животные, получавшие магния оротат в дозе 0,3 г/кг внутривентрикулярно в течение 18 дней и вальпроат натрия в дозе 50 мг/кг внутривентрикулярно в течение 4 дней до воспроизведения судорог.

Для определения противосудорожных свойств препаратов воспроизводили экспериментальную модель первично-генерализованной эпилепсии (судороги, вызванные электрическим и химическим воздействием) [3].

В экспериментальных группах судороги вызывали внутривентрикулярным введением тиосемикарбазид в дозе 28 мг/кг. При этом у животных всех групп регистрировали

экспериментальных животных определяли на 18-й день исследования с помощью стандартных наборов «Ольвекс». Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0.

Патогистологическое исследование секционного материала (головного мозга)

Патогистологическое исследование основано на сравнительном изучении секционного материала у животных 2-й и 3-й групп. Животных забивали на 21-е сутки. После краниотомии головной мозг извлекали целиком и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, через 1 сут с помощью фронтальных разрезов выделяли зону прецентральной извилины переднего мозга. Проводка нервной ткани осуществлялась по стандартной схеме (обезживание в этиловом спирте, ксилоле) с последующим изготовлением парафиновых блоков. Изготовленные на санном микротоме Microm гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Дубликаты срезов с помощью набора реактивов компании «Биовитрум» были окрашены по методу Ниссля и импрегнированы серебром. Морфометрическое исследование гистологических срезов проводилось на анализаторе изображения BioVision (Австрия) и заключалось в подсчете поврежденных нейроцитов пирамидного слоя коры полушарий переднего мозга в 10 разных полях зрения с последующей статистической обработкой результатов. Микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа Micros и цифровой окулярной камеры DCM 900.

Результаты и обсуждение. Установлено, что курсовое введение магния оротата достоверно увеличило содержание магния в плазме крови по сравнению с таковым у интактных животных и животных, у которых воспроизводили модель тиосемикарбазидовых судорог (рис. 1, а).

Однократное введение конвульсанта тиосемикарбазид в максимальной дозе привело к значимому снижению уровня магния в эритроцитах (рис. 1, б). Курсовое введение магния оротата сохранило уровень магния в эритроцитах на прежнем уровне. Комбинация магния оротата с противосудорожными средствами привела к значительному уменьшению уровня магния в эритроцитах (известно, что такие препараты, как вальпроат, стимулируют развитие дефицита магния). Возможно, реализация противосудорожного действия сопровождается выбросом магния из депо. Увеличение дозы препарата магния и длительности его введения способны восполнять истощенное депо, что требует дальнейшего изучения.

Результаты исследования показали, что курсовое введение магния оротата в указанной дозе на модели тиосемикарбазидовых судорог достоверно увеличило латентный период до начала судорог ($p=0,006$), снизило тяжесть судорожных приступов (по признакам «манежный бег» и «тониче-

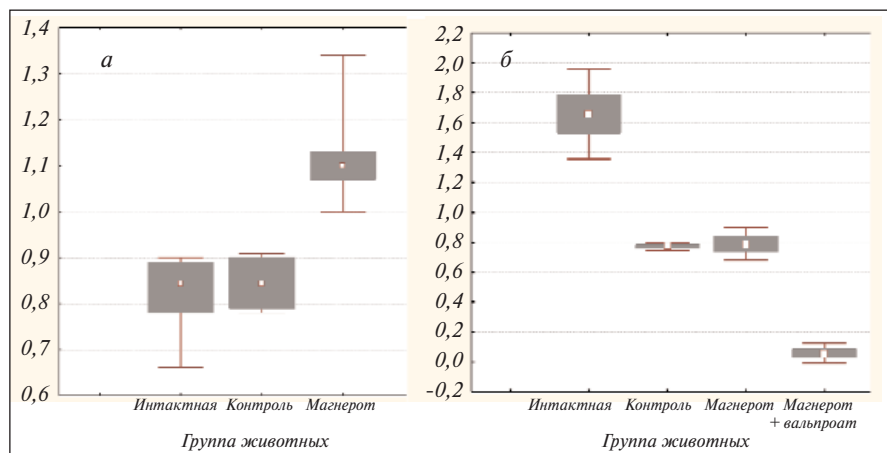


Рис. 1. Содержание магния (в ммоль/л) в плазме крови (а) и эритроцитах (б) у подопытных животных

латентное время до первого судорожного приступа, количество, характер судорог (вздрагивание, манежный бег, клонические судороги, тонико-клонические судороги с боковым положением, тоническая экстензия, тоническая экстензия, заканчивающаяся гибелью) и летальность в течение 90 мин. После одномоментной декапитации была получена кровь. Содержание магния в плазме крови и эритроцитах у

¹Магнерот® (Вёрваг Фарма ГмбХ и Ко. КГ).

ская экстензия»; $p=0,005$), уменьшило длительность судорог ($p=0,005$) и количество судорожных приступов ($p=0,018$; рис. 2). Летальность животных в группах, получавших магнерот, была существенно ниже и составила 83%, тогда как во 2-й группе (контроль) все животные погибли.

Гистологическое исследование. Эффекты приема магния оротата

Проведено сравнительное гистологическое исследование образцов секционного материала животных с моделью судорог (2-я группа, контроль) и животных с моделью судорог и приемом магния оротата (3-я группа). В контрольной группе во всех наблюдениях выявлено выраженное нарушение кровообращения на уровне микроциркуляторного русла, равномерно проявлявшееся в сером и белом веществе полушарий переднего мозга. В капиллярах явления гемостаза характеризовались агрегацией эритроцитов с выраженным периваскулярным отеком нервной ткани (рис. 3, а). Полнокровие венул сопровождалось дилатацией их просвета (рис. 3, б). В коре полушарий у 2 крыс выявлены мелкоочаговые периваскулярные кровоизлияния (рис. 3, в). В интрацеребральных артериях и артериях мяг-

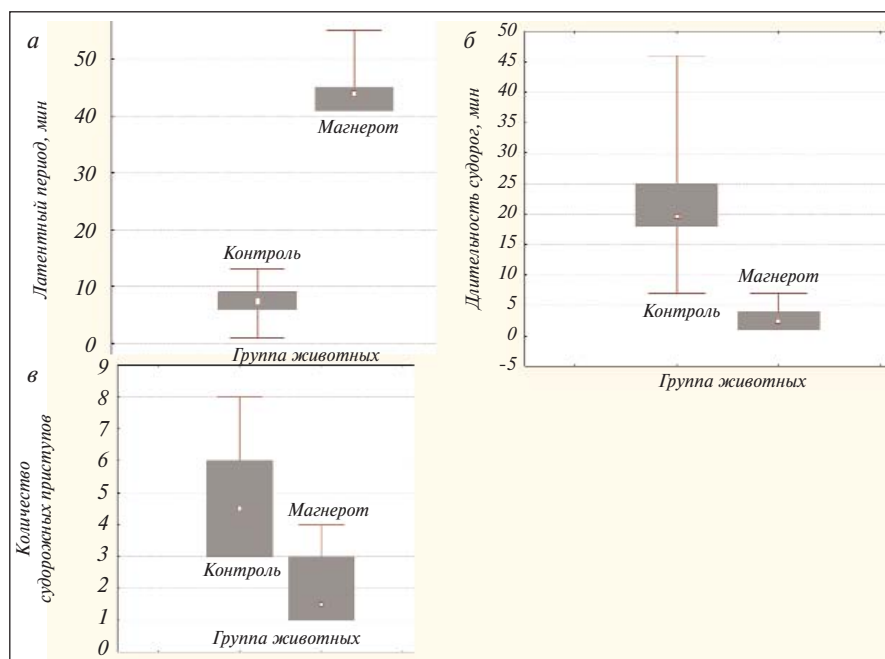


Рис. 2. Латентный период до судорожных приступов (а), их продолжительность (б) и количество (в) у животных контрольной группы и животных, получавших магния оротат

кой мозговой оболочки отмечены признаки стойкого спазма с перпендикулярной ориентацией эндотелиальных клеток и формированием интимальных подушечек (рис. 3, г).

В контрольной группе также отмечены выраженные повреждения нейроцитов. Ишемическое повреждение ней-

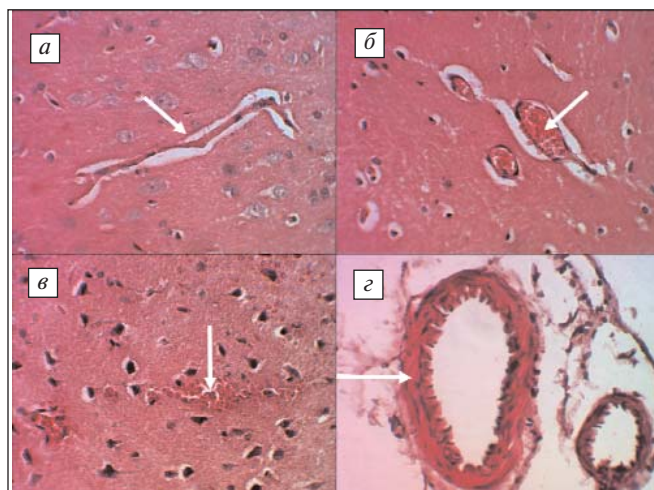


Рис. 3. Гистологическое исследование сосудов у животных с моделью судорог (2-я группа, контроль): а — агрегация эритроцитов, перикапиллярный отек серого вещества коры переднего мозга (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 480 (здесь и на рис. б–г); б — полнокровие и дилатация венул. Выраженный периваскулярный и перицеллюлярный отек нервной ткани (стрелка); в — мелкоочаговые диapedезные кровоизлияния в пирамидном слое коры больших полушарий (стрелка); г — спастическое состояние пиальной артерии (стрелка)

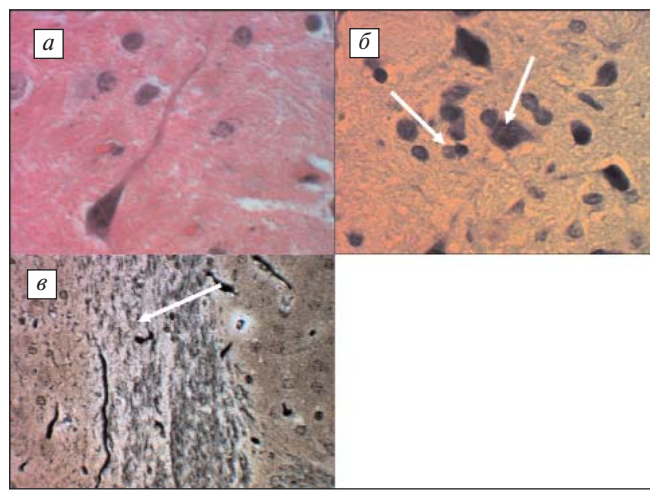


Рис. 4. Нейрогистологическое исследование нервной ткани у животных с моделью судорог (2-я группа, контроль): а — пирамидная нервная клетка коры с гомогенизированной цитоплазмой и набухшим аксоном. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 1200; б — некроз нейроцита с явлениями нейрофагии. Преобладание темных форм поврежденных нейронов (стрелки). Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Ув. 1200; в — комиссуральные волокна коры головного мозга имеют размытые контуры с участками демиелинизации (стрелка). Импрегнация серебром. Ув. 480

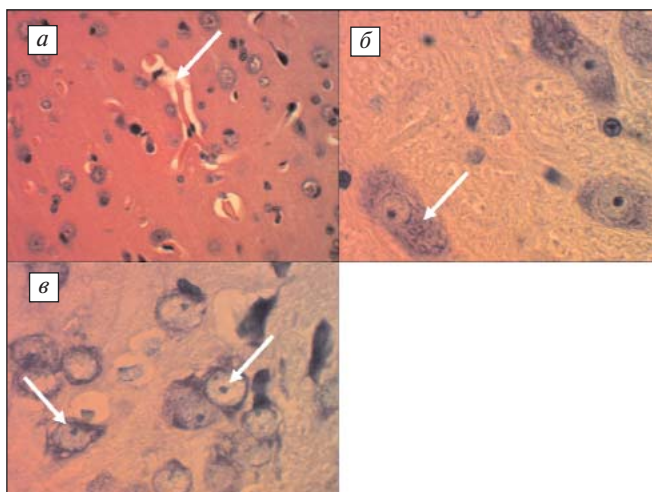


Рис. 5. Гистологическое исследование нервной ткани у животных с моделью судорог, получавших магния оротат: а — гемостаз, отек нервной ткани (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 480; б — в цитоплазме нейроцитов равномерно распределены мелкие глыбки Ниссля (стрелка). Окраска толуидиновым синим по Ниссля. Ув. 1200 (здесь и на рис. в); в — пролиферация олигодендроцитов (стрелки)

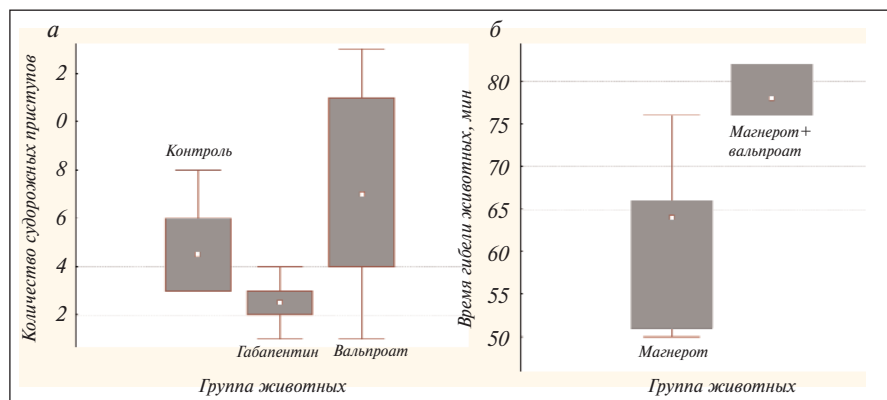


Рис. 7. Количество судорожных приступов и выживаемость в группах животных, получавших габапентин, вальпроат натрия + магния оротат, и в контрольной группе: а — количество судорожных приступов; б — время гибели животных в группах, получавших магнeзиум оротат

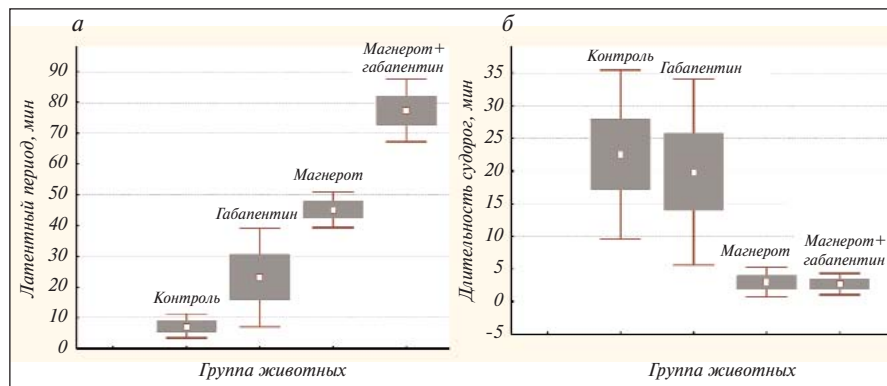


Рис. 8. Длительность латентного периода (а) и судорог (б) при раздельном и сочетанном приеме габапентина и магния оротата

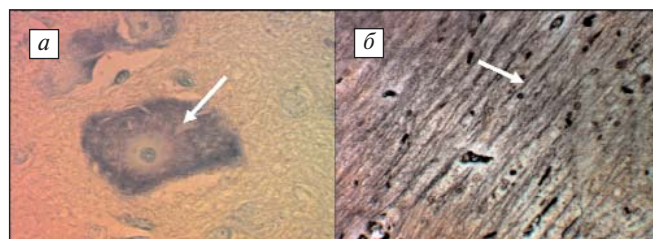


Рис. 6. Состояние нейроцитов у животных, получавших магния оротат: а — хроматолиз нейроцита (стрелка). Окраска толуидиновым синим по Ниссля. Ув. 1200; б — четкие контрастированные контуры комиссуральных волокон коры головного мозга (стрелка). Импрегнация серебром. Ув. 480

роцитов коры и подкорковых ядер выражалось в исчезновении грануляций Ниссля, в гомогенизации цитоплазмы с исчезновением контуров ядра, набуханием аксона (рис. 4, а). Наблюдалась гибель нейроцитов пирамидного слоя коры, сопровождавшаяся уменьшением объема клеток, гиперхромией цитоплазмы, размытием границ ядра, нейрофагической реакцией (рис. 4, б). Импрегнация серебром зон головного мозга, содержащих проводящие пути, показала неравномерную окраску и нечеткость контуров нервных волокон, а также очаговую пролиферацию микроглиальных элементов (рис. 4, в).

Гистологический анализ образцов, полученных у животных 3-й группы, показал, что расстройства кровообращения при приеме магнeзиум оротата характеризовались гемостазом в капиллярах, умеренно выраженным перикапиллярным и перипеллюлярным отеком нервной ткани коры и белого вещества переднего мозга (рис. 5, а), при этом только в 2 из 16 наблюдений выявлены мелкоочаговые кровоизлияния в стволе головного мозга. Спастическое состояние интрацеребральных и пинальных артерий зарегистрировано лишь в 1 случае. Значительная часть нейроцитов коры и подкорковых ядер на светоптическом уровне не имела структурных повреждений (рис. 5, б). В большинстве образцов отмечена выраженная реакция макроглиальных элементов, которая характеризовалась гипертрофией дренажных олигодендроцитов, очаговой пролиферацией астроцитов (рис. 5, в). Выраженная реакция макроглиальных элементов (пролиферация астроцитов, гипертрофия олигодендроцитов) при использовании магнeзиум оротата, возможно, связана с анаболическим эффектом оротовой кислоты.

При приеме магния оротата у животных отмечались менее выраженные повреждения нейроцитов и проводящих нервных путей, чем в контрольной группе. В цитоплазме

отдельных нейроцитов выявлен очаговый и тотальный лизис глыбок Ниссля при сохранении ядра (рис. 6, а), что позволяет рассматривать такие клетки как светлые формы повреждения нейроцитов. Импрегнация серебром проводящих путей головного мозга в большинстве наблюдений показала сохранность миелиновых оболочек нервных волокон, которые имели четкие контуры (рис. 6, б). Лишь в 2 из 16 наблюдений выявлены мелкие фокусы демиелинизации комиссуральных и ассоциативных волокон. Таким образом, имеются отличительные особенности в характере повреждения нейроцитов, выражающиеся в преобладании светлых форм у крыс, получавших магний оротат. Такие изменения нейроцитов принято считать обратимыми в отличие от преимущественного формирования темных форм нейроцитов в коре головного мозга у крыс контрольной группы.

Морфометрический анализ показал, что у животных 3-й группы количество поврежденных нервных клеток коры составило 34,2% по сравнению с таковым у животных 2-й группы, у которых было 49,8% поврежденных клеток при достоверных морфологических признаках необратимой гибели нейроцитов. Можно предположить, что использование магния оротата в качестве превентивной терапии у животных 3-й группы оказало хорошее нейропротективное действие на клетки коры головного мозга в условиях стресса (ишемии), вызванного судорогами, что подтверждено *сохранностью органелл цитоплазмы нейроцитов*.

Взаимодействие магния оротата с противосудорожными препаратами

При оценке тяжести судорожной активности было выявлено, что у животных, которые получали противосудорожный препарат габапентин (4-я группа) в указанной дозе на модели тиосемикарбазидовых судорог, достоверно увеличилось латентное время до первого судорожного приступа ($p=0,04$), уменьшилось количество судорожных приступов ($p=0,02$) по сравнению с таковыми в контрольной группе и группе, получавшей вальпроат натрия (рис. 7, а). В 4-й группе все животные выжили. При этом сочетание вальпроата с магния оротатом повышало выживаемость животных на 30% (рис. 7, б).

Сочетание магнерота с габапентином (5-я группа) достоверно уменьшило латентный период до развития судорог ($p=0,008$), ослабило тяжесть судорожных приступов (по признаку «тонико-клонические судороги»; $p=0,03$) и значительно сократило их длительность ($p=0,03$) по сравнению с таковыми в контроле (2-я группа) и группе, получавшей габапентин (4-я группа; рис. 8). При сравнении групп, получавших магния оротат, также выявлены достоверные изменения: у животных 5-й группы, которым вводили комбинацию магнерот + габапентин, по сравнению с животными 3-й

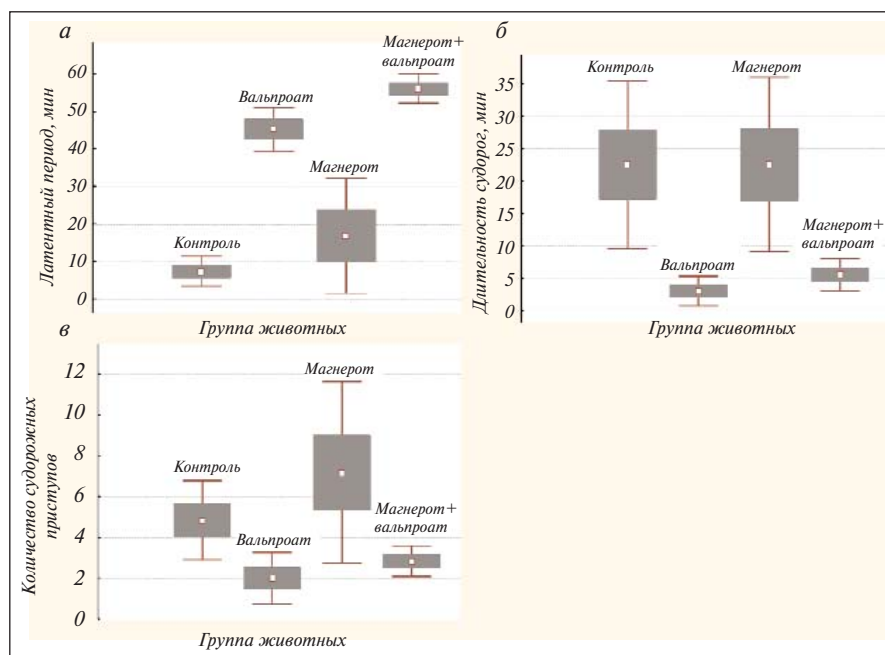


Рис. 9. Длительность латентного периода (а), судорог (б) и количество судорожных приступов (в) при раздельном и сочетанном приеме вальпроата и магния оротата

группы, получавшими только магнерот, достоверно уменьшался латентный период до появления судорог ($p=0,006$) и ослабевала тяжесть судорожных приступов (по признаку «клонические судороги»; $p=0,03$). В 5-й группе выживаемость животных составила 100%.

У крыс, которым вводили вальпроат натрия (6-я группа), при оценке тяжести судорог достоверных изменений по сравнению с контролем не наблюдалось. Однако летальность в этой группе составила 83,3%. В 7-й группе животных, получавших комбинацию магнерот + вальпроат натрия, достоверно увеличился латентный период до возникновения судорог ($p=0,006$) и уменьшилась их тяжесть по показателю «клонические судороги» ($p=0,03$) в сравнении с группой, получавшей вальпроат натрия (6-я группа). В 7-й группе животных, получавших сочетание магнерота с вальпроатом, по сравнению с группой, получавшей только магнерот (3-я группа), достоверно увеличился латентный период до развития судорог ($p=0,02$) и время до наступления гибели животных ($p=0,04$), уменьшилась выраженность судорожных приступов (рис. 9, а–в), в том числе по признакам «клонические судороги» ($p=0,03$) и «манежный бег» ($p=0,005$).

Таким образом, использованная тиосемикарбазидная модель приводит к развитию тяжелых судорог, выраженному ишемическому повреждению головного мозга и очень высокой смертности животных, приближающейся к 100%. Магнерот снижает тяжесть и длительность тиосемикарбазидных судорог, способствует защите нейроцитов от ишемии, обратимости ишемического повреждения нейронов и восстановлению морфологии тканей мозга. В результате достоверно повышается выживаемость животных.

С практической точки зрения, весьма интересным результатом данной работы является то, что магнерот потенцирует противосудорожное действие таких широко используемых средств, как габапентин и вальпроат натрия: совме-

стное применение габапентина и магнерота, вальпроата натрия и магнерота *per os* (в дозе 0,3 г/кг) достоверно удлиняет латентный период до начала судорог.

Тяжелое течение широкого круга заболеваний (эпилепсия, инсульт, детский церебральный паралич, алкогольное отравление, гипертермический синдром, некоторые инфекционные заболевания и др.) сопровождается развитием судорог. Сдерживающим фактором развития судорог является адекватная обеспеченность нервного волокна ионами магния [1], т. е. достаточная концентрация ионов магния в нервной и мышечной ткани поддерживает физиологическую нервно-мышечную проводимость. Образно выражаясь, магний является своего рода «изоляционным материалом» на пути проведения избыточного нервного импульса

[4–6]. Поэтому противосудорожную терапию обязательно следует сопровождать компенсацией дефицита магния.

Важным результатом обсуждаемого исследования является и то, что использование магнерота в качестве превентивной терапии оказало выраженный нейропротективный эффект на клетки коры головного мозга в условиях ишемии, что подтверждено обратимостью повреждения нейроцитов. При этом препарат снижал интенсивность процесса демиелинизации интрацеребральных нервных волокон и уменьшал до минимальных значений объем очага демиелинизации в сравнении с таковыми в контрольной группе. Препараты, способствующие сохранению миелиновых оболочек и не оказывающие побочного действия, весьма востребованы в современной неврологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Громова ОА. Магний и пиридоксин: основы знаний. Москва: ПротоТип; 2006. 234 с. [Gromova OA. *Magnii i piridoksin: osnovy znaniy* [Magnesium and pyridoxine: basic knowledge]. Moscow: ProtoTip; 2006. 234 p.].
2. Торшин ИЮ, Громова ОА. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. Москва: МЦНМО; 2012. 684 с. [Torshin IYu, Gromova OA. *Ekspertnyi analiz dannykh v molekulyarnoi farmakologii* [Expert data analysis in molecular pharmacology]. Moscow: MTsNMO; 2012. 684 p.].
3. Хабриев РУ, редактор. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых лекарственных веществ. Москва: Медицина; 2005. С. 281–9. [Khabriev RU, editor. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh lekarstvennykh veshchestv* [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmaceutical substances]. Moscow: Meditsina; 2005. P. 281–9.].
4. Селянина НВ. Мозговой нейротрофический фактор как прогностический критерий развития когнитивных нарушений у больных острой черепно-мозговой травмой. Медицинский альманах. 2013;(1):127–9. [Selyanina NV. Brain-derived neurotrophic factor as a prognostic criterion for the development of cognitive impairment in patients with acute traumatic brain injury. *Meditsinskii al'manakh*. 2013;(1):127–9. (in Russ.)].
5. Селянина НВ, Каракулова ЮВ. Активация репаративных процессов в остром периоде черепно-мозговой травмы под влиянием нейротрофической терапии. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012;112(5):46–9. [Selyanina NV, Karakulova YuV. Activation of reparative processes in the acute period of traumatic brain injury under the influence of neurotrophic therapy. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2012;112(5):46–9. (in Russ.)].
6. Торшин ИЮ, Громова ОА. Magnesium and Pyridoxine: Fundamental Studies and Clinical Practice. New York: Nova Science Publishers; 2011.

Поступила 10.10.2016

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Исследование проведено при поддержке «Вёрваг Фарма ГмБХ и Ко. КГ». Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.