

І. Ф. Бєленічев, А. А. Єгоров, І. А. Мазур

Вплив нового похідного L-лізину на показники окислювального стресу та розвиток неврологічного дефіциту у тварин з гострим порушенням мозкового кровообігу

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, L-лізін, нейропротекція, антиоксидантна активність

Незважаючи на досягнуті успіхи в лікуванні й профілактиці гострих порушень мозкового кровообігу, вони як і раніше є однією з основних причин смертності населення [1]. Одним із провідних патофізіологічних чинників пошкодження мозку є порушення його кисневого режиму, яке приводить до ініціювання глутамат-кальцієвого каскаду, що призводить до смерті нейрона, викликаючи підвищення концентрації іонів кальцію усередині клітини, активацію синтезу оксиду азоту, окислювальної модифікації білків, ліпідів і нуклеїнових кислот, та в подальшому розвитку лактат-ацидозу, набряку-набухання тканини головного мозку і пошкодженню гематоенцефалічного бар'єру [1–3].

Натепер у комплексну терапію мозкових інсультів включають антагоністи глутаматних рецепторів, блокатори кальцієвих каналів, антиоксиданти й інші препарати. Перспективним напрямом сучасної нейропротекції є модуляція афінності збуджувачих і гальмівних рецепторів мозку, що дозволяє зменшити явища глутаматної ексайтотоксичності [4]. Подібні властивості має амінокислота L-лізін. Остання в організмі людини перетворюється в піпеколієву кислоту, та посилює афінність ГАМК-бензодіазепін-рецепторного комплексу. У нейрохірургічній і неврологічній практиці застосовується препарат L-лізину есцинат як протинабряковий і капляростабілізуючий засіб. Проте до теперішнього часу нейропротек-

тивні властивості L-лізину і його похідних не вивчалися. З метою створення високоефективних нейропротекторів була отримана нова сполука L-лізину (М-1), у якій кислотним залишком є похідне 1,2,4-триазолу [5].

Мета дослідження – вивчення нейропротекторної дії сполуки М-1 за впливом на показники окислювального стресу в тканинах головного мозку і проявів неврологічного дефіциту у тварин в гострому періоді гострого порушення мозкового кровообігу порівняно із тіотриазоліном, L-лізину есцинатом і базовим нейропротектором – пірацетамом [4, 6].

Матеріали та методи. Експериментальна частина дослідження виконана на білих безпородних щурах-самцях масою 160–210 грамів. Гостре порушення мозкового кровообігу (ГПМК) викликали незворотною двобічною оклюзією загальних сонних артерій. Процедуру виконували під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг). Шляхом хірургічного доступу виділяли загальні сонні артерії, підводили під них шовкові лігатури і перев'язували [7].

Тварини були розподілені на 6 експериментальних груп по 10 тварин. Перша група – удаванооперовані тварини, друга – тварини із ГПМК, третя – тварини із ГПМК, яким вводили тіотриазолін (50 мг/кг), четверта – тварини з ГПМК, яким вводили L-лізину есцинат (50 мг/кг), п'ята – тварини з ГПМК і введенням пірацетаму (500 мг/кг), шоста – тварини з ГПМК і введенням нового похідного L-лізину, сполуки М-1 (50 мг/кг). Усі препарати вводили внутрішньоочеревинно, одразу після виходу тварин із наркозу, один раз у добу протягом 4 днів.

Неврологічний дефіцит у тварин визначали за шкалою stroke-index

С. Р. McGrow [8]. Тяжкість стану визначали за сумою відповідних балів: до 3 балів – легкий ступінь, з 3 до 7 балів – середній ступінь і з 7 балів і вище – важкий ступінь.

Після закінчення терміну спостереження тварин виводили з експерименту під етамінал-натрієвим наркозом шляхом декапітації. Мозок швидко витягували, відділяли скроневі долі, які гомогенізувалися на холоді в сольовому ізотонічному середовищі (0,15 М КСІ) при температурі +4 °С у скляному гомогенізаторі. Співвідношення тканина – сольовий розчин складало 1:40. Після чого методом диференціального центрифугування виділяли цитозольну фракцію (15000 g) [9]. Екстракцію ліпідів проводили за методом Кейтса [10]. У гомогенаті біохімічними методами визначали зміст продуктів окислювальної модифікації білків (ОМВ) за рівнем альдегідних (АФГ) і карбоксильних (КФГ) продуктів у реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [11]. Також визначали вміст маркерів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – дієнових кон'югатів (ДК), триенкетонів (ТК) і малонового діальдегіду (МДА) [12]. Стан антиоксидантної системи визначали за активністю каталази [13].

Відмінності між групами оцінювали статистично з використанням параметричного t-критерія Стьюдента за допомогою програми «Biostat» і MS Excell. За достовірні вважали відмінності з рівнем значущості більше 95 % ($P < 0,05$).

Результати та їх обговорення. Моделювання гострого порушення мозкового кровообігу за типом ішемічного інсульту спричиняло розвиток важкого неврологічного дефіциту у всіх експериментальних тварин (табл. 1). У тварин усіх експериментальних груп (крім удаванооперованих) спостерігали парези кінцівок, двобічний або однобічний птоз, характерні маневрні (кругові) рухи. На 4 добу експерименту в групі тварин із ГПМК (контроль) середній бал за шкалою McGrow склав 12,16 балів. Летальність тварин контрольної групи максимально виявлялася на 2 добу експерименту і наприкінці спостереження становила 30 %. Найбільш активною серед досліджених сполук у цьому відношенні була М-1, що мала виражену активність щодо попередження розвитку важких неврологічних порушень, (середній бал становив 5,88), летальність знижувалася на 60 %, відносно тварин з ГПМК без проведення терапії. Введення тіотриазоліну підвищувало відсоток тварин, що вижили на 40 % відносно показника контрольної групи, а також на 4,5 балів знижувався неврологічний дефіцит, який в цій групі на 4 добу склав в середньому 7,42 балів. L-лізину есцинат знижував неврологічний дефіцит на 3,6 балів і сприяв виживанню 70 % прооперованих тварин. За впливом на неврологічну симптоматику найменш ефективним був пірацетам. При його введенні спостерігалось зниження неврологічних порушень на 2,3 балів, а смертність тварин склала 50 %.

Таблиця 1

Вплив М-1 і препаратів порівняння на розвиток неврологічного дефіциту в тварин у гострий період ГПМК ($M \pm m$)

Група тварин	Середній бал за шкалою С. Р. McGrow	Кількість тварин, що вижили, на 4 добу, %
Удаванооперовані тварини (n=10)	0,30 ± 0,15	100
Тварини із ГПМК (n=3)	12,16 ± 1,45	30
Тварини із ГПМК + тіотриазолін (n=7)	7,42 ± 1,02*	70
Тварини із ГПМК + L-лізину есцинат (n=7)	8,57 ± 1,05*	70
Тварини із ГПМК + пірацетам (n=5)	9,80 ± 1,06*	50
Тварини із ГПМК + М-1 (n=9)	5,88 ± 0,71*§#	90

Примітка. Тут і в табл. 2–3: * $P < 0,05$ по відношенню до контролю,

$P < 0,05$ по відношенню до групи з введенням L-лізину есцинату,

§ $P < 0,05$ по відношенню до групи з введенням пірацетаму,

⊠ $P < 0,05$ по відношенню до групи з введенням тіотриазоліну.

Проведення біохімічних досліджень показало, що двобічна оклюзія загальних сонних артерій призводить до розвитку оксидативного стресу, про що свідчить підвищення маркерів ОМБ і ПОЛ у тканині мозку експериментальних тварин на фоні пригнічення активності антиоксидантних ферментів. Так, у головному мозку тварин із ГПМК спостерігалось збільшення ранніх маркерів деструкції білків (альдегідфенілгідразонів) у 2,7 разів, а концентрація пізніх маркерів руйнування білкової молекули (кетонфенілгідразонів) зростала в 4,65 разів. Паралельно відбувалося накопичення в тканині мозку й продуктів перекисного окислення ліпідів – дієнових кон'югатів і триєнокетонів (табл. 3). Результати проведеної фармакокорекції свідчать про наявність найбільш вираженого антиоксидантного ефекту у двох досліджених сполук – М-1 та тіотриазоліну (табл. 2, 3).

Введення сполук М-1 у гострий період ГПМК чинило антиоксидантну дію.

Найбільш вираженою активність М-1 виявлялася за гальмуванням окислювальної модифікації білкових молекул. Так, на 4 добу експерименту вміст маркерів ОМБ – АФГ і КФГ у групі, яка отримувала М-1, знижувався на 51,8 та 72,7 % відповідно ($P < 0,05$). Результатами проведених досліджень показано значне падіння активності каталази в мозку тварин із церебральною ішемією на 53,8 % порівняно з аналогічним показником удаванооперованих тварин. Проведення лікування М-1 сприяло підвищенню активності цього ферменту в середньому на 66 % (табл. 2).

Аналіз результатів дослідження інтенсивності вільно-радикального окислення показав, що найбільшу активність показали М-1 та тіотриазолін (табл. 3).

У результаті проведених досліджень найбільшу нейропротекторну активність проявила сполука М-1, яка за показниками неврологічного дефіциту, зменшенням летальності та зниженням

Таблиця 2

Вплив М-1 і препаратів порівняння на окислювальну модифікацію білків і активність каталази в головному мозку на 4 добу ГПМК ($M \pm m$)

Група тварин	Продукти ОМБ, у.о./г білка		Каталаза, мкат/мг білка/хв
	АФГ	КФГ	
Удаванооперовані тварини (n=10)	1,75 ± 0,23	0,82 ± 0,19	9,60 ± 0,24
Тварини із ГПМК (n=6)	4,78 ± 0,51	3,82 ± 0,50	4,43 ± 0,30
Тварини із ГПМК + L-лізина есцинат (n=7)	3,47 ± 0,45	1,41 ± 0,25*	5,85 ± 0,09*
Тварини із ГПМК + тіотриазолін (n=7)	2,11 ± 0,28*	1,10 ± 0,21*	5,80 ± 0,12*
Тварини із ГПМК + пірацетам (n=7)	3,60 ± 0,32	1,47 ± 0,16*	4,19 ± 0,20
Тварини із ГПМК + М-1 (n=9)	2,30 ± 0,34*#§	1,04 ± 0,33*	7,37 ± 0,23*#§¤

Таблиця 3

Вплив М-1 і препаратів порівняння на процеси вільнорадикального окислення в головному мозку на 4 добу ГПМК ($M \pm m$)

Група тварин	ТК, мкмоль/г тканини	ДК, мкмоль/г тканини	МДА, мкмоль/г тканини
Удаванооперовані тварини (n=10)	0,42 ± 0,06	1,13 ± 0,05	0,59 ± 0,07
Тварини із ГПМК (n=6)	1,62 ± 0,02	2,85 ± 0,02	1,40 ± 0,02
Тварини із ГПМК + L-лізина есцинат (n=7)	0,67 ± 0,02*	1,69 ± 0,03*	0,83 ± 0,02*
Тварини із ГПМК + тіотриазолін (n=7)	0,63 ± 0,03*	1,55 ± 0,03*	0,62 ± 0,02*
Тварини із ГПМК + пірацетам (n=7)	0,82 ± 0,08*	2,16 ± 0,04*	0,98 ± 0,05*
Тварини із ГПМК + М-1 (n=9)	0,57 ± 0,07*§	1,47 ± 0,07*§	0,67 ± 0,07*§

маркерів ОМБ, достовірно перевищувало дію пірацетаму та L-лізину есцинату, а за впливом на активність каталази в ішемізованому мозку достовірно перевершувала дію пірацетаму, тіотриазоліну та L-лізину есцинату.

Таким чином, нове похідне М-1, отримане шляхом модифікації структу-

ри тіотриазоліну за рахунок введення до його складу незамінної амінокислоти L-лізину, проявляє високу нейропротекторну активність, що експериментально підтверджено зниженням летальності та неврологічних проявів, а також обмеженням проявів оксидативного стресу.

1. *Островая Т. В.* Церебропротекция в аспекте доказательной медицины / Островая Т. В., Черный В. И. // Медицина неотложных состояний. – 2007. – № 2 (9). – С. 15–21.
2. *Скворцова В. И.* Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и нейропротекция / В. И. Скворцова // Вест. РАМН. – 2003. – № 11. – С. 74–81.
3. Отечный синдром: современные возможности интенсивной терапии / Усенко Л. В. [и др.] // Медицина неотложных состояний. – 2006. – № 1 (2). – С. 21–26.
4. Рациональная нейропротекция / [И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник и др.]. – Донецк: Издатель Заславский А. Ю., 2009. – 262 с.
5. L-лизина эсцинат в комплексе интенсивной терапии полиэтиологического поражения головного мозга / Черный В. И., Колесников А. Н., Черный Е. В. [и др.] // Международный неврологический журнал. – 2006. – № 3. – С. 45–49.
6. Фармакобиохимические аспекты противоишемического действия препарата «Тиотриазолин» в условиях эксперимента / Дунаев В. В., Беленичев И. Ф., Мазур И. А., Стец В. Р. // «Актуальні питання фармац. та медичної науки і практики»: Зб. наук. пр. – Запоріжжя, 2002. – Вип. 8. – С. 73–81.
7. *Буреш Я.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 527 с.
8. *McGrow C. P.* Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / McGrow C. P. // Arch. Neurol. – 1977. – V. 34, № 6. – P. 334 – 336.
9. *Прохорова М. И.* Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М. И. Прохорова. – Л.: Изд-во Ленинградского университета. – 1982. – 272 с.
10. *Кэйтс Р.* Методы липидологии / Р. Кэйтс. – М.: Мир, 1974. – 370 с.
11. *Halliwell B.* Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. – Oxford Press, 1999. – 248 p.
12. Продукти вільнорадикального окиснення та методи їх ідентифікації (огляд літератури) / Беленичев І. Ф., Левицький Е. Л., Губський Ю. І. [та ін.] // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 4. – С. 9–14.
13. Метод определения активности каталазы / Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16 – 19.

И. Ф. Беленичев, А. А. Егоров, И. А. Мазур

Влияние нового производного L-лизина на показатели окислительного стресса и развитие неврологического дефицита у животных с острым нарушением мозгового кровообращения

В статье представлены результаты влияния нового производного L-лизина на показатели окислительного стресса и развитие неврологического дефицита у подопытных животных (крыс) при моделировании острого нарушения мозгового кровообращения, путем двусторонней перевязки сонных артерий.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, L-лизин, нейропротекция, антиоксидантная активность

I. F. Belenichev, A. A. Egorov, I. A. Mazur

Researches for influence of the new derivative of L-lysine on the indexes of oxidizing stress and development of neurological deficiency in animals with acute violation of cerebral blood circulation

There are presented in the article the results of influence of new derivative of L-lysine on the indexes of oxidative stress and development of neurologic deficit in experimental animals (rats) at simulation of the acute violation of cerebral blood circulation by the bilateral bandaging of carotids.

Key words: acute violation of cerebral blood circulation, L-lysine, neuroprotection, antioxydative activity

Надійшла: 24.11.2009 р.

Контактна особа: Беленичев І. Ф., проф., д. біол. наук, завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури, Запорізький Державний медичний університет, пр. Маяковського, 6, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: (612) 342-741.