



УДК 615.214.015.4:616.831-005-036.1-092.9

С. А. Моргунова

Нейропротективное действие нейротрофического церебропротектора Цереброкурин в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения

*Запорожский государственный медицинский университет***Ключевые слова:** острое нарушение мозгового кровообращения, нейропротекция, нейропептид, Цереброкурин.

Высокая частота нарушений мозгового кровообращения обуславливает актуальность дополнительного изучения патогенетических механизмов развития церебральной ишемии, а также дальнейшего поиска и изучения высокоэффективных церебропротекторов. С целью получения сравнительной оценки безопасности и нейропротективного действия препарата Цереброкурин изучена зависимость эффекта от путей его введения. Результаты исследования показали преимущество интратекального способа введения препарата над внутривенным. Полученный эффект выражался в повышении выживаемости животных, уменьшении проявлений митохондриальной дисфункции, торможении оксидативного стресса, активации антиоксидантной системы в головном мозге крыс. Результаты свидетельствуют об эффективности интратекального способа введения препарата Цереброкурин в условиях острого нарушения мозгового кровообращения.

Нейропротективна дія нейротрофічного церебропротектора Цереброкурин в умовах моделювання гострого порушення мозкового кровообігу

С. А. Моргунова

Висока частота порушень мозкового кровообігу обґрунтовує актуальність додаткового вивчення патогенетичних механізмів розвитку церебральної ішемії, а також подальшого пошуку і вивчення високоефективних церебропротекторів. З метою порівняльного оцінювання безпеки і нейропротективної дії препарату Цереброкурин вивчили залежність ефекту від шляхів його введення. Результати дослідження показали перевагу інтратекального способу введення препарату над внутрішньочеревинним. Цей ефект виявлявся у підвищенні виживаності тварин, зменшенні проявів митохондріальної дисфункції, гальмуванні оксидативного стресу, активації антиоксидантної системи в головному мозку щурів. Результати свідчать про ефективність інтратекального способу введення препарату Цереброкурин в умовах гострого порушення мозкового кровообігу.

Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, нейропротекція, нейропептид, Цереброкурин.
Запорізький медичний журнал. – 2014. – №5 (86). – С. 36–40

Neuroprotection neurotrophic cerebroprotector Cerebrocurin in terms of modeling acute stroke

S. A. Morguntsova

Aim. The high frequency of cerebral blood flow causes the relevance of further study pathogenic mechanisms of cerebral ischemia and the search and study of highly cerebroprotector. In order to obtain comparative evaluation of the safety and neuroprotective effect of the drug Cerebrocurin the dependence of the effect on the ways of administration.

Methods and results. Results of the study revealed the advantage of intrathecal route of administration before the intraperitoneal. The effect is manifested in increased survival of animals, decrease the manifestations of mitochondrial dysfunction, oxidative stress inhibition, activation of the antioxidant system in rat brain.

Conclusion. The obtained results show the effectiveness of the intrathecal route of administration Cerebrocurin in the context of an acute cerebrovascular accident.

Key words: Stroke, Neuroprotection, Neurotropheptides, Cerebrocurin.
Zaporozhye medical journal 2014; №5 (86): 36–40

Отмеченный в последние годы рост распространенности сосудистых заболеваний обусловил увеличение частоты острых нарушений мозгового кровообращения. По данным международных исследований, среди всех видов инсульта преобладают ишемические поражения мозга. Соотношение ишемического и геморрагического инсультов составляет в среднем 5,0–5,5:1 [1,2]. Эти обстоятельства определяют особую актуальность дальнейшего поиска высокоэффективных церебропротекторов, а также дополнительного изучения патогенетических механизмов развития церебральной ишемии [2,4].

В последнее время ведется активный поиск высокоэффективных нейропротекторов среди нейропептидов. Открытие нейротрофических пептидных факторов привело к формированию новой стратегии фармакотерапии нейродеге-

неративных заболеваний – пептидергической, или нейротрофической [2,4]. В клинике появился новый нейропептидный препарат – Цереброкурин, который содержит свободные аминокислоты, нейропептиды и низкомолекулярные продукты контролируемого протеолиза низкомолекулярных белков и пептидов эмбрионов крупного рогатого скота. Механизм действия и точки приложения Цереброкурина принципиально отличаются от других препаратов нейропептидной природы. Цереброкурин содержит пептиды, несущие программу анализа состояния и строительства ЦНС. Таким образом, конечный эффект различается из-за качественно отличного механизма действия. Вместе с тем, Цереброкурин увеличивает аффинность связывания BDNF с его рецепторами [2]. В экспериментальных исследованиях обнаружена способность Цереброкурина предотвращать



гиперактивацию микроглии и снижать продукцию ИЛ-1 α и других провоспалительных цитокинов, что отражает влияние препарата на выраженность местной воспалительной реакции и процессов оксидативного стресса в ишемизированной зоне мозга [3].

Некоторые исследователи показали, что внутривенное и, тем более, внутримышечное введение нейропептидов снижает их терапевтическое действие за счет деструктивного действия ферментов, нарушения механизмов молекулярного транспорта, защитной функции гематоэнцефалического барьера [2,6]. Потребности клиники диктуют необходимость максимально быстрой доставки лечебных доз препаратов в пораженные участки мозга [2,6,10]. Разработанная в Институте нейрохирургии АМН Украины система дозируемого введения препаратов (PUMP-система) в спинномозговое пространство фармакологических эквивалентов (интратекальное введение с помощью имплантационного насоса) способна решить эту проблему. Для утверждения нового пути введения Цереброкурина необходимо провести сравнительную оценку нейропротективной активности при интратекальном и внутрибрюшинном путях введения, а также установить отсутствие аллергизирующего и местно-раздражающего действия.

Цель работы

Провести сравнительную оценку безопасности и нейропротективного действия препарата Цереброкурин при интратекальном и внутрибрюшинном путях введения по влиянию на процессы митохондриальной дисфункции, энергетический метаболизм, оксидативный стресс в головном мозге.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть проведена на монгольских песчанках (*Meriones unculatus*) массой 70–90 г. Карантин для всех животных составлял 14 дней. Животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, разделены на группы с помощью метода рандомизации. Клетки с животными помещены в отдельные комнаты. Световой режим: 12 ч – свет, 12 ч – темнота. Температура воздуха – в пределах 19–25°C, относительная влажность – 50–70%. Установлен режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час. Животных помещали в клетки (400×320×160 мм) по 6 особей в каждой. Рацион питания – зерно, хлеб, корнеплоды. Нарушение мозгового кровообращения вызывали необратимой односторонней перевязкой сонной артерии. Операцию проводили под этаминал-натриевым (40 мг/кг) наркозом [5].

В работе использовали Цереброкурин производства ООО «НИР», г. Киев, Украина (2 мл раствора для инъекций). Препарат вводили сразу после выхода животных из наркоза внутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 4 дней в дозе 0,001 мл/100г (контрольная группа). Опытной группе цереброкурин вводили интратекально 1 раз в сутки в течение 4 дней в дозе 0,0005 мл/100 г.

После выхода животных из наркоза определяли развитие неврологического дефицита по шкале stroke-index С. Р. McGrow. Тяжесть состояния определяли по сумме баллов: до 3 баллов – легкая, 3–7 баллов – средняя, от 7 баллов и выше – тяжелая

степень. Отмечали парезы, параличи конечностей, тремор, маневные движения, птоз, положение на боку, подвижность, как проявление неврологического дефицита рассматривали удерживание крыс на вращающемся стержне диаметром 15 см (скорость 3 об/мин). Животных тестировали ежедневно, выставляя сумму баллов. На 4 сутки животных выводились из эксперимента под этаминал-натриевым наркозом путем декапитации [5].

Выделенное ишемизированное полушарие головного мозга тщательно промывали охлажденным 0,9% раствором КС1 (4°C), измельчали и гомогенизировали в 10-кратном объеме среды: сахарозы – 250 мМ; трисНС1-буфера – 20мМ, ЭДТА – 1 мМ (рН 7,4) [5]. Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировали 7 мин при 700 г (4°C). Затем супернатант центрифугировали повторно 15 мин при 11 000 г (4°C). Митохондрии суспендировали в небольшом объеме среды выделения, не содержащей ЭДТА, и хранили на льду. Образование поры регистрировали спектрофотометрически при 540 нм (A_{540}). Открытие митохондриальной поры инициировали путем добавления в суспензию митохондрий избытка глутамата и кальция [8,9].

Для оценки биоэнергетических процессов в гомогенате головного мозга хроматографически определяли АТФ, АДФ, АМФ, интермедиаты энергетического обмена – малат, пирuvat, лактат и активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [5]. Интенсивность оксидативного стресса и состояние антиоксидантной системы головного мозга определяли по содержанию маркеров окислительной модификации белка (ОМБ) – альдегидфенилгидразонов (АФГ) и карбоксилфенилгидразонов (КФГ), а также по активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатионпероксидазы (ГПР) [5–7,10]. Об ишемическом повреждении тканей головного мозга судили по гиперферментемии ВВ-КФК [5].

Анализ нормальности распределения оценивали по критериям Колмогорова – Смирнова (D) и Lilliefors, а также Shapiro-Wilk (W). В качестве критериев согласия оценивали величину асимметрии и эксцесса распределения данных. Когда невозможно было отбросить нулевую гипотезу о статистически значимых различиях распределения переменных от нормального, использовали непараметрические методы анализа данных, в других случаях – параметрические. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки репрезентативности выборочного среднего значения. Результаты обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., № АХХR712D833214FAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003». Отдельные статистические процедуры и алгоритмы реализованы в виде специально написанных макросов в соответствующих программах. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Перевязка общей сонной артерии вызывала тяжелые неврологические изменения у животных (параличи, парезы, птоз) с максимальным проявлением на 4 сутки. Так, в группе нелеченных животных средний балл по шкале С.Р. McGrow составлял 18,3 балла, что соответствует тяжелой степени неврологической симптоматики (табл. 1).

Влияние Цереброкурина на выживаемость и развитие неврологического дефицита животных в различные сроки после ОНМК

Группа животных	Количество крыс с тяжелой симптоматикой, %		Средний балл по шкале С.Р. McGrow		Количество выживших животных, 4 сутки, %
	1 сутки	4 сутки	1 сутки	4 сутки	
Интактные животные	0	0	0	0	100
Животные с ОНМК	70	100	7,3±2,52	18,3±2,33	30
Животные с ОНМК + Цереброкурин, и/т	10*	30*	2,8±0,18*	4,8±0,28*	100*
Животные с ОНМК + Цереброкурин, в/б	30	50*	3,1±0,47*	6,2±1,07*	80*

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю.

На 4 сутки в контрольной группе выжило 30% животных. Введение животным с острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК) Цереброкурина оказывало выраженный нейропротективный эффект. Наиболее выраженное действие было в группе с интратекальным введением препарата. Так, на 4 сутки эксперимента средний балл составлял 4,8 (в группе, получавшей препарат в/б, – 6,2 балла). Выживаемость в группе животных с ОНМК, получавшей Цереброкурин интратекально, на 4 сутки составляла 100%, а в группе, получавшей Цереброкурин внутривенно, – 80%.

Проведенные исследования показали, что курсовое назначение Цереброкурина при интратекальном введении приводило к нормализации энергетического обмена, дефицит которого отмечен в группе животных с ОНМК. Так, на 4 сутки в группах, получавших Цереброкурин, восстанавливалась продукция энергии, о чем свидетельствовало повышение АТФ и АДФ, а также снижение уровня АМФ по сравнению с группой нелеченных животных. В группах животных, получавших Цереброкурин, значительно снижалась скорость открытия митохондриальной поры, что свидетельствует об уменьшении митохондриальной дисфункции. Эффективность Цереброкурина, вводимого интратекально, была выше, чем при внутривенном введении (табл. 2).

Назначение Цереброкурина значительно интенсифици-

рует окислительные реакции образования АТФ, снижая непродуктивный анаэробный гликолиз и уменьшая проявления лактат-ацидоза (табл. 3). В группах, получавших Цереброкурин, отмечено значительное повышение уровня малата, пирувата и активности СДГ на фоне снижения содержания лактата. Подобное энерготропное действие Цереброкурина объясняется его позитивным влиянием на процессы митохондриальной дисфункции в условиях ОНМК. Установлена способность Цереброкурина тормозить открытие митохондриальной поры на 4 сутки модельной патологии (табл. 2). По этому показателю наиболее эффективным было интратекальное введение препарата.

Способность Цереброкурина тормозить открытие митохондриальной поры, по нашему мнению, является ключевым моментом в механизме его действия. По нашим результатам, а также по данным специализированной литературы, развитие митохондриальной дисфункции приводит к нарушению обратного захвата медиаторов, ионного транспорта, генерации и проведения импульса, синтеза белка de novo, процессов трансляции и транскрипции, активизации «паразитных» энергопродуцирующих реакций. Это приводит к существенной убыли энергетических запасов нейрональной клетки и ее гибели. В точных биохимических исследованиях установлено, что нарушение кислородного режима тканей,

Таблица 2

Влияние Цереброкурина при интратекальном способе введения на продукцию энергии в головном мозге животных с ОНМК на 4 сутки эксперимента

Группы животных	АТФ, мкм/г	АДФ, мкм/г	АМФ, мкм/г	Скорость открытия митохондриальной поры
Интактные животные	2,95±0,05	0,47±0,01	0,13±0,02	11,8±1,21
Животные с ОНМК(контроль)	1,12±0,08	0,21±0,01	0,21±0,01	52,6±2,11
Животные с ОНМК + Цереброкурин, и/т	2,81±0,01*	0,40±0,01*	0,14±0,03*	18,7±1,22*
Животные с ОНМК + Цереброкурин, в/б	2,31±0,02*	0,37±0,09*	0,14±0,03*	26,6±1,18*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

Таблица 3

Влияние Цереброкурина при интратекальном введении на интермедиаы энергетического обмена в головном мозге животных с ОНМК на 4 сутки эксперимента

Группы животных	Пируват, мкм/г	Лактат, мкм/г	Малат, мкм/г	СДГ, мкм/мг/мин
Интактные животные	0,47±0,01	2,32±0,06	0,42±0,02	7,44±0,10
Животные с ОНМК (контроль)	0,20±0,01	8,52±0,11	0,15±0,05	2,88±0,17
Животные с ОНМК + Цереброкурин, и/т	0,41±0,02*	3,42±0,11*	0,48±0,06*	8,10±0,12*
Животные с ОНМК + Цереброкурин, в/б	0,36±0,004*	4,11±0,14*	0,36±0,04*	6,87±0,15*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.



гиперпродукция эксайтотоксичных аминокислот, снижение «нормальной» аккумуляции Ca^{2+} митохондриями, повреждение мембраны митохондрий АФК усиливает открытие пор и высвобождение апоптогенных белков из поврежденных митохондрий и инициирует митоптоз [2,3]. Большая эффективность интратекального введения может быть объяснена непосредственным влиянием составляющих лекарственный комплекс Цереброкурина на клеточные и субклеточные воспринимающие сайты.

Введение животным с ОНМК Цереброкурина оказывало ингибирующее действие в отношении различных звеньев оксидативного стресса. Так, в группах, получивших Цереброкурин, отмечено значительное снижение маркеров ОМБ – АФГ и КФГ в головном мозге (табл. 4).

Таблица 4

Влияние Цереброкурина при интратекальном способе введения на показатели окислительной модификации белков в мозге животных и активность ВВ-КФК в сыворотке крови на 4 сутки ОНМК

Показатель	Продукты ОМБ, у.е./г белка		ВВ-КФК, мМол/л/ч
	АФГ, 270 нм	КФГ, 363 нм	
Группы животных			
Интактные животные	0,83±0,04	0,56±0,02	0,037±0,001
Животные с ОНМК (контроль)	6,77±0,3	4,93±0,1	0,132±0,001
Животные с ОНМК + Цереброкурин, и/т	2,88±0,23*	1,57±0,08*	0,040±0,001*
Животные с ОНМК + Цереброкурин, в/б	3,51±0,1*	2,32±0,09*	0,060±0,001*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Установлено также позитивное влияние курсового назначения Цереброкурина на показатели антиоксидантной системы головного мозга в условиях ОНМК (табл. 5).

Таблица 5

Влияние Цереброкурина при интрацеребральном способе введения на показатели антиоксидантной системы в мозге животных на 4 сутки ОНМК

Группа животных	СОД, у.е./мг белка/мин	Каталаза, мкат/мг белка/мин	ГПР, мкмоль/мг белка/мин
Интактные животные	283,4±11,6	7,91±0,71	78,4±4,8
Животные с ОНМК (контроль)	108,6±6,21	2,44±0,32	32,7±0,12
Животные с ОНМК + Цереброкурин, и/т	277,5±4,72*	6,30±0,51*	61,6±0,11*
Животные с ОНМК + Цереброкурин, в/б	201,6±4,21*	5,45±0,32*	54,0±0,21*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Список литературы

- Беленичев И.Ф. Доклиническое изучение специфической активности эндотелиопротективных препаратов : метод. рекомендации ГЭЦ МЗ Украины / И.Ф. Беленичев, И.С. Чекман, Е.А. Нагорная. – К. : [б. в.], 2014. – 60 с.
- Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленичев, В.И. Черный, Ю.М. Колесник [и др.]. – Донецк : Издатель Заславский, 2009. – 262 с.
- Антиоксиданты: клинико-фармакологические аспекты / И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев, Н.А. Горчакова и др. // Украинський медичний часопис. – 2014. – № 1. – С. 22–28.
- Механизмы развития когнитивного дефицита под действием кислородных радикалов в условиях стресса / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, Е.Л. Левицкий и др. // Современные проблемы токсикологии. – 2006. – № 3. – С. 8–12.
- Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов : метод. рекомендации ГФЦ МОЗ Украины / И.С. Чекман, Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев и др. – К. : [б. в.], 2010. – 81 с.
- Антиоксиданты как нейропротекторы при ишемическом инсульте / О.В. Поварова, Е.И. Каленикова, Е.И. Городецкая и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66. – № 3. – С. 69–73.
- Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М.И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 272 с.
- Стефанов А.В. Доклинические исследования лекарственных средств / А.В. Стефанов. – К. : Авиценна, 2002. – 568 с.



9. The thiol-disulfide balance and the nitric oxide system in the brain tissue of rats subjected to experimental acute impairment of cerebral blood flow: The therapeutic effects of nootropic drugs / I.F. Belenichev, S.V. Gorbacheva, A.V. Demchenko, N.V. Bukhtiyarova // *Neurochemical Journal*. – 2014. – Vol. 8. – № 1. – P. 24–27.
10. Scott B. Oxidative stress, oxidants and antioxidants / B. Scott, O. Auroma // *Exp. Physiol.* – 1999. – Vol. 8. – № 6. – P. 291–295.

References

1. Belenichev, I. F., Chekman, I. S., & Nagornaya N. A. (2014). *Doklinicheskie izucheniya spetsificheskoy aktivnosti endotelioprotektivnykh preparatov: metodicheskie rekomendatsii GE C MZ Ukrainy* [Preclinical studying of specific activity endotelioprotektivnykh of preparations: method. recommendations of GETs MZ of Ukraine]. Kyiv. [in Ukrainian].
2. Belenichev, I. F., Chernij, V. I., Kolesnyk, Yu. M., Pavlov, S. V., Andronova, I. A., & Abramov, A. V. (2009). *Ratsional'naya nejroproteksiya* [Rational neuroprotection], Doneck: Izdatel' Zaslavskij. [in Ukrainian].
3. Chekman, I. S., Belenichev, I. F., Gorchakova, N. A., Kucherenko, L. I., Bukhtiyarova, N. V., & Pogotova, G. A. (2014). Antioksidanty: kliniko-farmakologicheskie aspekty [Antioxidants: clinical and pharmacological aspects]. *Ukrainskyi medychnyi chasopys*, 1, 22–28. [in Ukrainian].
4. Gubskij, U., Belenichev, I., Levickij, E., Pavlov, S., & Gorushko, A. (2006). Mekhanizmy razvitiya kognitivnogo deficita pod dejstviem kislородnykh radikalov v usloviyakh stressa [Mechanisms of development cognitive deficiency under action oxygen radicals in conditions of stress]. *Sovremennye problemy toksikologii*, 3, 8–12. [in Ukrainian].
5. Chekman, I. S., Belenichev, I. F., Gubskij, Yu. I., Gromov, L. A., Kolesnik, Yu. M., & Bukhtiyarova, N. V. (2010). *Doklinicheskie izucheniya spetsificheskoy aktivnosti potencial'nykh nejroprotektivnykh preparatov: metodicheskie rekomendatsii GFC MZ Ukrainy* [Preclinical study of the specific activity of potential neuroprotective drugs: method. recommendations of GFTs MZ of Ukraine]. Kyiv. [in Ukrainian].
6. Povarova, O. V., Kalenikova, E. I., Gorodeckaya, E. I., & Medvedev, O. S. (2003). Antioksidanty kak nejroprotektory pri ishemičeskom insul'te [Antioxidants as neuroprotectors against acute ischemic stroke]. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 66(3), 69–73. [in Russian].
7. Prohorova, M. I. (Ed.). (1982). *Sovremennye metody biokhimicheskikh issledovanij (lipidnyj i energeticheskij obmen)* [Modern methods of biochemical tests (lipid and energy metabolism)]. Leningrad: Izd-vo Leningradskogo universiteta. [in Russian].
8. Stefanov, A. V. (2002). *Doklinicheskie issledovaniya lekarstvennykh sredstv* [Preclinical studies of drugs] Kyiv: Avicenna. [in Ukrainian].
9. Belenichev, I. F., Gorbacheva, S. V., Demchenko, A. V., & Bukhtiyarova N. V. (2014). The thiol-disulfide balance and the nitric oxide system in the brain tissue of rats subjected to experimental acute impairment of cerebral blood flow: The therapeutic effects of nootropic drugs. *Neurochemical Journal*, 8(1), 24–27. doi: 10.1134/S181971241401005X.
10. Scott, B. & Auroma, O. (1999). Oxidative stress, oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 8(6), 291–295.

Сведения об авторе:

Моргунцова С.А., к. биол. н., доцент каф. фармакологии и медицинской рецептуры, начальник учебного отдела, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: morguntsovaodonovskaya@mail.ru.

Поступила в редакцию 12.09.2014 г.