

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

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НОВОЙ СОЛИ L-ЛИЗИНА  
НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И РАЗВИТИЕ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА  
У ЖИВОТНЫХ С ОСТРЫМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ**

*Запорожский государственный медицинский университет*

**Ключові слова:** гостре порушення мозкового кровообігу, L-лізин, нейропротекція, антиоксидантна активність.

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

**Key words:** acute violation of cerebral circulation of blood, L-lysine, neuroprotection, antioxydants activity.

У статті представлено результати впливу нової солі L-лізину на показники окислювального стресу і розвиток неврологічного дефіциту у піддослідних тварин (щурів) при моделюванні гострого порушення мозкового кровообігу шляхом двосторонньої перев'язки сонних артерій.

В статті представлені результати впливу нової солі L-лізину на показатели окислительного стресса и развитие неврологического дефицита у подопытных животных (крыс) при моделировании острого нарушения мозгового кровообращения путем двусторонней перевязки сонных артерий.

In the article the results of influence of new salt of L-lysine are presented on the indexes of oxidizing stress and development of neurological deficiency for experimental animals (rats) at the design of acute violation of cerebral circulation of blood, by the bilateral bandaging of carotids.

Несмотря на достигнутые успехи в лечении и профилактике острых нарушений мозгового кровообращения, они по-прежнему являются одной из основных причин смертности населения [1]. Одним из ведущих патологических факторов повреждения мозга является нарушение кислородного режима мозга, которое приводит к инициализации глутамат-кальциевого каскада. Реакции этого каскада приводят к смерти нейрона, вызывая повышение концентрации ионов кальция внутри клетки, активацию синтеза оксида азота, окислительной модификации белка, липидов и нуклеиновых кислот [1-2], а также развитию лактат-ацидоза, отека-набухания ткани головного мозга и, как результат, повреждению гематоэнцефалического барьера [3].

В настоящее время в комплексную терапию мозговых инсультов включают антагонисты глутаматных рецепторов, блокаторы кальциевых каналов, антиоксиданты и другие препараты. Перспективным направлением современной нейропротекции является модуляция аффинности возбуждающих и тормозных рецепторов мозга, что позволяет уменьшить явления глутаматной эксайтотоксичности [4]. Подобными свойствами обладает аминокислота L-лизин, а ее соль L-лизина эсцинат применяется в нейрохирургической и неврологической практике в качестве противотечного и капилляростабилизирующего средства. Однако до настоящего времени не изучались нейропротективные свойства L-лизина и его производных. С целью создания высокоэффективных нейропротекторов была получена новая соль L-лизина, где в качестве кислотного остатка присутствует производное триазола [5].

**ЦЕЛЬЮ** данного **ИССЛЕДОВАНИЯ** является изучение нейропротективного действия соединения М-1 по влиянию на показатели окислительного стресса в тканях головного мозга и проявления неврологического дефицита у животных в остром периоде острого нарушения мозгового кровообра-

щения в сравнении с тиотриазолином, L-лизина эсцинатом и базовым нейропротектором – пирацетамом [4, 6].

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Экспериментальная часть выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 160-210 г. Острое нарушение мозгового кровообращения вызывали необратимой двусторонней окклюзией общих сонных артерий. Процедуру выполняли под этиминал-натриевым наркозом (40 мг/кг). Путём хирургического доступа выделяли общие сонные артерии, подводили под них шелковые лигатуры и перевязывали [7].

Животные были разделены на 6 экспериментальных групп по 10 животных. Первая группа – ложнооперированные животные, вторая – животные с ОНМК, третья – животные с ОНМК, которым вводили тиотриазолин (50 мг/кг), четвертая – животные с ОНМК, которым вводили L-лизина эсцинат (50 мг/кг), пятая - животные с ОНМК и введением пирацетама (500 мг/кг), шестая – животные с ОНМК и введением М-1 (50 мг/кг), Изучаемые препараты вводили внутрибрюшинно сразу после выхода животных из наркоза, один раз в сутки в течение 4 дней.

Неврологический дефицит у животных определяли по шкале stroke – index С.Р. McGrow [8]. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов: до 3 баллов – лёгкая степень, с 3 до 7 баллов – средняя степень и с 7 баллов и выше – тяжёлая степень.

По истечении срока наблюдения животные выводились из эксперимента под этиминал-натриевым наркозом путем декапитации. Мозг быстро извлекался, отделялись височные доли, которые гомогенизировались на холоде, в солевой изотонической среде (0,15 М КСl) при температуре +4°C, с помощью стеклянного гомогенизатора, в соотношении ткань - солевой раствор 1:40. После чего методом дифференциального центрифугирования выделялась цитозольная фракция (15000 g) [9]. Экстракцию липидов проводили по методу



Кейтса [10]. В гомогенате биохимическими методами определяли содержание продуктов окислительной модификации белков по уровню альдегидных (АФГ) и карбоксильных (КФГ) продуктов в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [11]. Также определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК), триенкетон (ТК) и малонового диальдегида (МДА) [12]. Состояние антиоксидантной системы определяли по активности каталазы [13].

Отличия между группами оценивали статистически с использованием параметрического критерия t-Стьюдента с помощью программы «Biostat» и MS Excell. Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ( $p < 0,05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование острого нарушения мозгового кровообращения по типу ишемического инсульта вызывало развитие тяжелого неврологического дефицита у всех экспериментальных животных (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние М-1 и препаратов сравнения на развитие неврологического дефицита у животных в острый период ОНМК ( $M \pm m$ )**

Группа животных	Средний балл по шкале С.Р. McGrow	Кол-во выживших животных на 4-е сутки, %
Ложнооперированные животные (n=10)	0,3 ± 0,15	100
Животные с ОНМК (n=6)	12,16 ± 1,64	30
Животные с ОНМК + тиотриазолин (n=7)	7,42 ± 1,02*	70
Животные с ОНМК + L-лизина эсцинат (n=7)	8,57 ± 1,17	70
Животные с ОНМК + пирацетам (n=7)	9,8 ± 1,06*	50
Животные с ОНМК + М-1 (n=9)	5,88 ± 0,71* <sup>§#</sup>	90

У животных всех экспериментальных групп отмечались парезы конечностей, двусторонний или односторонний птоз, характерные маневры (круговые) движения. На 4

сутки эксперимента в группе животных с ОНМК (контроль) средний балл по шкале McGrow составил 12,16 балла. Летальность животных контрольной группы максимально проявлялась на 2-е сутки эксперимента и к концу наблюдения отмечалась на уровне 30%. Сравнения наиболее активным в этом отношении был тиотриазолин. Введение этого препарата повышало процент выживших животных на 40% относительно показателя контрольной группы, а также на 4,5 балла снижался неврологический дефицит, который в этой группе на 4 сутки составил в среднем 7,42 балла. Проведение терапии производным тиотриазолина – соединением М-1 показало наличие у этого препарата выраженной активности в отношении предупреждения развития тяжелых неврологических нарушений и регистрацией в группе с введением М-1 в среднем 5,88 балла. Относительно животных с ОНМК без проведения терапии, М-1 снижал неврологический балл животных в 2 раза, что соответствует 51,6%. L-лизина эсцинат снижал неврологический дефицит на 3,6 балла и способствовал выживанию 70% прооперированных животных. В отношении неврологической симптоматики наименее эффективным был пирацетам. При его введении наблюдалось снижение неврологических нарушений на 2,3 балла, а смертность животных составила 50%.

Проведение биохимических исследований показало, что двусторонняя окклюзия общих сонных артерий приводит к развитию оксидативного стресса, о чем свидетельствует повышение маркеров ОМБ и ПОЛ в тканях мозга экспериментальных животных на фоне угнетения активности антиоксидантных ферментов. Так, в головном мозге животных с ОНМК наблюдалось увеличение ранних маркеров деструкции белков (альдегидфенилгидразонов) в 2,7 раза, а концентрация поздних маркеров разрушения белковой молекулы (кетонфенилгидразонов) возрастала в 4,65 раз. Параллельно отмечалось накопление в тканях и продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов и триенкетон. (табл. 2,3). Результаты проведенной фармакокоррекции свидетельствуют о наличии наиболее выраженного антиоксидантного эффекта у двух препаратов – тиотриазолина и М-1 (табл. 2, 3).

Введение препарата М-1 в острый период ОНМК оказывало существенное антиоксидантное действие. Наиболее выраженной активностью М-1 как антиоксиданта проявлялась в отношении торможения окислительной модификации

Таблица 2

**Влияние М-1 и препаратов сравнения на окислительную модификацию белков и активность каталазы в головном мозге на 4 сутки ОНМК ( $M \pm m$ )**

Группа животных	Продукты ОМБ, у.е./г белка		Каталаза, мкат/мг белка/мин
	АФГ	КФГ	
Ложнооперированные животные (n=10)	1,75 ± 0,23	0,82 ± 0,19	9,6 ± 0,24
Животные с ОНМК (n=6)	4,78 ± 0,51	3,82 ± 0,5	4,43 ± 0,3
Животные с ОНМК + L-лизина эсцинат (n=7)	3,47 ± 0,45	1,41 ± 0,25*	5,85 ± 0,09*
Животные с ОНМК + тиотриазолин (n=7)	2,11 ± 0,28*	1,1 ± 0,21*	7,35 ± 0,08*
Животные с ОНМК + пирацетам (n=7)	3,6 ± 0,32	1,47 ± 0,16*	4,19 ± 0,2
Животные с ОНМК + М-1 (n=9)	2,3 ± 0,34* <sup>§#а</sup>	1,04 ± 0,33* <sup>а</sup>	7,37 ± 0,23* <sup>§#а</sup>

**Влияние М-1 и препаратов сравнения на процессы свободно-радикального окисления в головном мозге на 4 сутки ОНМК (M±m)**

Группа животных	ТК, мкмоль/г ткани	ДК, мкмоль/г ткани	МДА, мкмоль/г ткани
Ложнооперированные животные (n=10)	0,42 ± 0,06	1,13 ± 0,05	0,59 ± 0,07
Животные с ОНМК (n=6)	1,62 ± 0,02	2,85 ± 0,02	1,4 ± 0,02
Животные с ОНМК + L-лизина эсцинат (n=7)	0,67 ± 0,02*	1,69 ± 0,03*	0,83 ± 0,02*
Животные с ОНМК + тиотриазолин (n=7)	0,63 ± 0,03*	1,55 ± 0,03*	0,62 ± 0,02*
Животные с ОНМК + пираретам (n=7)	0,82 ± 0,08*	2,16 ± 0,04*	0,98 ± 0,05*
Животные с ОНМК + М-1 (n=9)	0,57 ± 0,07*§	1,47 ± 0,07**§ <sup>a</sup>	0,67 ± 0,07**§ <sup>a</sup>

белковых молекул. Так, на 4 сутки эксперимента содержание маркеров ОМБ – АФГ и КФГ в группе, которая получала М-1, составило 2,3±0,34 и 1,04±0,33 у.е./г белка, что статистически значимо на 51,8% и 72,7% ниже соответствующих показателей группы контроля. Результатами проведенных исследований показано значительное падение активности каталазы в мозге животных с церебральной ишемией на 53,8% в сравнении с аналогичным показателем ложнооперированных животных. Проведение лечения тиотриазолином и М-1 способствовало повышению активности этого фермента в среднем на 66% в обеих экспериментальных группах (табл. 2).

Анализ результатов исследования интенсивности свободно-радикального окисления показал, что наибольшую показали тиотриазолин и соединение М-1, однако последнее достоверно превосходило по показателям тиотриазолин (табл. 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований наибольшую нейропротективную и антиоксидантную активность проявила соль L-лизина – М-1. По выраженности своего эффекта М-1 достоверно превышал показатели L-лизина эсцината и пираретама, а также тиотриазолин по показателям окислительной модификации белка и влиянию на процессы свободно-радикального окисления.

**ЛИТЕРАТУРА.**

1. Островая Т.В., Черный В.И. Церебропротекция в аспекте доказательной медицины. - //Медицина неотложных состояний. – 2007. - №2 (9). – с. 15-21.
2. Скворцова В.И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и нейропротекция // Вест. РАМН. – 2003. - №11.

**Сведения об авторах:**

Беленичев И.Ф., проф., д. биол. н., зав. каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.

Егоров А.А., ст. лаборант каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.

Мазур И.А., проф., д. фарм. н., зав. каф. фармацевтической химии ЗГМУ.

**Адрес для переписки:**

Егоров Артем Анатольевич. Украина, 69035, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26, Запорожский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии и медицинской рецептуры. E-mail: datas9@rambler.ru

– С.74-81.

3. Усенко Л.В. и др. Отечный синдром: современные возможности интенсивной терапии // 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. Черный В.И., Колесников А.Н., Черный Е.В., соавт. L-лизина эсцинат в комплексе интенсивной терапии полиэтиологического поражения головного мозга. - //Международный неврологический журнал. – 2006. - №3. – с. 45-49.

6. Дунаев В.В., Беленичев И.Ф., Мазур И.А., Стец В.Р. Фармако-биохимические аспекты противоишемического действия препарата «Тиотриазолин» в условиях эксперимента //«Актуальні питання фармац. та медичної науки і практики»: Зб. наук. ст. – Запоріжжя, 2002. – Вип.8. – С.73-81.

7. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991. – 527с

8. McGrow C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils // Arch. Neurol. - 1977. - Vol.34, №6. - P.334-336.

9. Прохорова М.И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) – Л.: Изд-во Ленинградского университета. – 1982. – 272с

10. Кэйтс Р. Методы липидологии. – М.: Мир, 1974. – 370с.

11. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. – Oxford Press, 1999. – 248 p.

12. Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л., Губський Ю.І. та ін. Продукти вільнорадикального окиснення та методи їх ідентифікації (огляд літератури) // Совр. пробл. токсикол. -2002. - №4. – С.9-14.

13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. - №1. – С.16-19.