



Ю.М. Колесник, И.Ф. Беленичев, А.А. Егоров, А.В. Абрамов, И.А. Мазур, Л.И. Кучеренко

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРЕПАРАТА «ЛИЗИНИЙ» НА ИШЕМИЧЕСКУЮ ДЕСТРУКЦИЮ НЕЙРОНОВ СЕНСОМОТОРНОЙ ЗОНЫ ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Запорожский государственный медицинский университет,
НПО «Фарматрон», г. Запорожье

Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, L-лізин, нейропротекція, нейрони, гліальні клітини.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, L-лизин, нейропротекция, нейроны, глиальные клетки.

Key words: acute ischemic stroke, L-lysine, neuroprotection, neurons, glial cells.

Подано результати ушкодження нейронів сенсомоторної зони фронтальної кори при моделюванні церебральної ішемії у піддослідних тварин (щурів) і корекція цих змін сполуками L-лізину, зокрема новою сполукою «Лізиній».

Представлены результаты повреждения нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры при моделировании церебральной ишемии у подопытных животных (крыс) и коррекция этих изменений соединениями L-лизина, в частности новым соединением «Лизиний».

The results of neurons damage of sensorimotor area of the frontal cortex in experimental cerebral ischemia in rats and correction of these changes by L-lysine compounds, in particular by new compound «Lysiniy» are given in the article.

Поражение сосудов головного мозга, а также осложнения, связанные с ним, являются основной причиной экстренной госпитализации и длительной инвалидизации населения. Наиболее грозным осложнением является острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), которое занимает второе место среди причин смертности взрослого населения [1,2]. В последние годы активно ведутся поиски новых соединений, действие которых было бы направлено на профилактику и лечение ОНМК.

Механизм нейродеструкции в условиях церебральной ишемии многогранен и сложен, включает в себя целый каскад патобиохимических реакций. В результате ОНМК происходит активация анаэробного гликолиза и избыточное образование лактата, что приводит к развитию лактацидоза, формирование которого обуславливает дискоординацию в цикле Кребса, что выражается в снижении уровня аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ), наряду с увеличением содержания аденозинмонофосфата (АМФ). В условиях энергодефицита в клетках усиливается продукция активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, развитие оксидативного стресса, являющегося основным повреждающим фактором при церебральной ишемии. В этих условиях происходит повреждение белков и липидов клеточной мембраны нейрона, что приводит к их окислительной модификации и накоплению продуктов деструкции [1–8]. Исходя из этого, одной из актуальных задач современной фармакологии является поиск универсальных нейропротекторов, действие которых было бы направлено на ключевые этапы повреждения нейрона [1,5,7,9,10].

Углубленного изучения ожидает перспективный нейропротектор – незаменимая аминокислота L-лизин, которая при попадании в организм метаболизируется в пипероновую кислоту, которая, в свою очередь, усиливает аффинность ГАМК-бензодиазепин-рецепторного комплекса и, как результат, уменьшается гипервозбудимость глутаматных

рецепторов, снижается глутаматная эксайтотоксичность и выброс возбуждающих аминокислот [8,11–12]. В последние годы в неврологии и нейрохирургии успешно применяется отечественный препарат L-лизина эсцинат, который обладает выраженным противоотечным, капилляростабилизирующим, противовоспалительным и обезболивающим действием [13,14]. В качестве антиоксиданта и энерготропа в неврологии широкое применение нашел препарат «Тиотриазолин» [15]. С целью создания нового высокоэффективного нейропротектора на НПО «Фарматрон» под руководством проф. И.А. Мазура получено новое химическое соединение путем введения L-лизина в триазоловый цикл, и сочетающее в себе лучшие свойства тиотриазолина и L-лизина (Патент Российской Федерации №21370492 от 04.06.2007). Проведенными исследованиями установлена способность этого соединения, получившего рабочее название «Лизиний», улучшать энергетический метаболизм ишемизированного головного мозга, ограничивать повреждающее действие оксидативного стресса [16,17]. Доклинические исследования «Лизиния» продолжаются.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение нейропротективного эффекта «Лизиния» в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по влиянию на морфологические показатели повреждения нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, полученных из питомника ГУ «Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины». Все животные содержались на стандартном рационе питания вивария, при естественной смене дня и ночи. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех крыс составляла 14 дней. В течение



этого времени проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день крыс наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Животные, не соответствующие критериям, исключались из исследования в течение карантина. Клетки с крысами помещались в отдельные комнаты. Все экспериментальные процедуры и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с «Положением об использовании животных в биомедицинских исследованиях».

Острое нарушение мозгового кровообращения вызывали необратимой двухсторонней окклюзией общих сонных артерий [18]. Процедуру выполняли под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг).

В качестве референс-препаратов взяты известные средства первичной и вторичной нейропротекции – L-лизина эсцинат, тиотриазолин, пирарцетам, которые внутривентрикулярно вводили в эффективных дозах [1, 13, 15] 1 раз в сутки в течение 4 дней. Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределены на группы с помощью метода рандомизации. Всего выделено 6 экспериментальных групп по 10 животных. Первая – ложнооперированные животные, вторая – крысы с ОНМК, третья – животные с ОНМК и введением L-лизина эсцината (50 мг/кг), четвертая – крысы с ОНМК и введением «Лизиния» (50 мг/кг), пятая – животные с ОНМК и введением тиотриазолина (50 мг/кг), шестая – крысы с ОНМК и введением пирарцетама (500 мг/кг).

На четвертые сутки животные выводились из эксперимента под этаминал-натриевым наркозом путем декапитации. С целью изучения результатов фармакокоррекции, у экспериментальных животных извлекали мозг, фиксировали его в 10% жидкости Буэна (24 ч) и по стандартной схеме заливали в парафиновые блоки, из которых готовили серийные фронтальные 5-микронные гистологические срезы в области постцентральной извилины (сомато-сенсорная кора) [19]. Для изучения морфофункционального состояния нейронов IV–V слоев коры гистологические срезы депарафинировали по стандартной методике и окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для специфического выявления РНК [20]. Изображение коры мозга получали на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) и с помощью 8-битной CCD-камеры COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Морфометрический анализ клеток мозга осуществляли в автоматическом режиме с помощью макро-программы, разработанной в специализированной среде программирования VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия) [21].

Определяли следующие показатели:

- плотность нейронов, глиальных клеток, апоптотических и деструктивно измененных нейронов (количество клеток на 1 мм² площади среза коры мозга);
- площадь тел нейронов, апоптотических и деструктивно измененных нейронов (мкм²);
- концентрацию РНК в нейронах, апоптотических и деструктивно измененных нейронах (единицы оптической

плотности, $E_{оп}$), которые рассчитывали как логарифм отношения оптической плотности тела клетки к оптической плотности межклеточного вещества.

Сравнение групп проводили при помощи критерия Mann-Whitney. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA for Windows 6.1» (StatSoft Inc., №АХХ R712D833214SAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перевязка общих сонных артерий приводила к гибели 40% животных к 4-м суткам эксперимента. В группах, получавших «Лизиний», гибель составляла 10%, в группе, получавшей тиотриазолин и L-лизина эсцинат, – по 20%, а в группе с пирарцетамом – 50%. Экспериментальное моделирование церебральной ишемии приводило к уменьшению плотности и площади тел нейронов в контрольной группе животных относительно группы интакта (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика нейронов IV–V слоев коры головного мозга крыс с экспериментальной ишемией, $M \pm m$

Экспериментальные группы	Плотность нейронов, клеток/мм ²	Площадь тел нейронов, мкм ²	Содержание РНК в нейронах, $E_{оп}$
Ложнооперированные животные (n=10)	1352±43	74,33±1,33	9,66±0,13
Животные с ОНМК (n=6)	989±9	68,49±0,41	5,52±0,03
Животные с ОНМК + L-лизина эсцинат (n=8)	1097±34*	77,89±0,98*	7,88±0,1*
Животные с ОНМК + Лизиний (n=9)	1327±10*	70,55±0,58*	10,00±0,11*
Животные с ОНМК + тиотриазолин (n=8)	1193±21*	67,42±0,44	9,87±0,12*
Животные с ОНМК + пирарцетам (n=5)	1000±34	54,00±0,26	7,88±0,13*

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

Введение «Лизиния» увеличивало плотность нейронов на 74%, достоверно превосходя показатели группы контроля ($p < 0,05$). Введение тиотриазолина увеличивало плотность нейронов на 20,63%.

Назначение L-лизина эсцината достоверно увеличивало площадь нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры головного мозга только на 13,72% относительно контроля и уступало по эффективности как «Лизинию», так и тиотриазолину (табл. 1). В предыдущих исследованиях [15] выяснено, что пирарцетам в дозе 250 мг/кг оказывал негативное влияние и активизировал нейродегенеративные процессы. Поэтому в данном исследовании его использовали в дозе 500 мг/кг. Экспериментальная терапия животных с ОНМК и введением пирарцетама приводила к незначительному увеличению плотности нейронов в коре на 4-е сутки ишемии (1,11%). Количество апоптотических и деструктивно измененных нейронов при введении пирарцетама животным



с ОНМК не отличалось от показателя в группе контрольных животных в острый период ишемии, но в отдаленные сроки он достоверно снижал процент апоптотических нейронов, способствовал сохранению высокой функциональной активности нейроглии (табл. 2, 3). Таким образом, парацетам в острый период мозгового инсульта не обладает церебропротективным действием, т. к., влияя исключительно на анаэробное окисление, способен усиливать явления лактат-ацидоза и, тем самым, ухудшать общую картину ишемии мозга, что в целом подтверждается результатами биохимических экспериментальных и клинических исследований [15,17].

Таблица 2
Характеристика глиальных клеток IV–V слоев коры головного мозга крыс с экспериментальной ишемией, $M \pm m$

Экспериментальные группы	Плотность глиальных клеток, клеток/мм ²	Площадь тел глиальных клеток, мкм ²	Содержание РНК в глиальных клетках, E_{on}
Ложнооперированные животные (n=10)	416±20	20,8±0,37	3,39±0,08
Животные с ОНМК (n=6)	411±5	22,97±0,09	3,00±0,02
Животные с ОНМК + L-лизина эсцинат (n=8)	445±14*	23,08±0,18	3,78±0,04*
Животные с ОНМК + лизиний (n=9)	498±13*	24,70±0,11*	4,18±0,02*
Животные с ОНМК + тиотриазолин (n=8)	490±11*	22,31±0,12	4,17±0,02*
Животные с ОНМК + парацетам (n=5)	421±19	21,11±0,17	3,60±0,01*

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

Изучение состояния нейроглии в условиях ОНМК также выявило значительное уменьшение плотности и площади тел клеток (табл. 2). Введение исследуемых соединений в различной степени влияло на состояние глиоцитов. Так, введение «Лизиний» повышало плотность глиальных клеток в 1,4 раза и увеличивало содержания в них РНК в 1,2 раза ($p < 0,05$). Тиотриазолин оказывал нейропротективное действие у крыс с ОНМК. Названный препарат в условиях ОНМК вызывает значительный глиоцитоз как в острый период, так и в отдаленные сроки, который выражался увеличением общей площади глиальных клеток и их плотности. Также при введении тиотриазолина отмечено повышение содержания РНК в клетках нейроглии, что свидетельствует о повышении функциональной активности клеток, активации генов и синтезе белка. Глиоцитоз является компенсаторным механизмом, который включается при повреждении нервной ткани. В основе противоишемического действия тиотриазолина лежит его способность усиливать компенсаторную активацию анаэробного гликолиза, снижать степень угнетения окислительных процессов в цикле Кребса и сохранять, тем самым, внутриклеточный фонд АТФ,

стабилизировать метаболизм нейронов [1].

В условиях церебральной ишемии резко увеличивается количество деструктивно измененных нейронов. В группе животных с ОНМК отмечается увеличение доли апоптотических клеток в 1,57 раза относительно интактной группы (табл. 3). Наибольшую активность на снижение явлений апоптоза оказало соединение «Лизиний». Так, его назначение приводило к уменьшению плотности деструктивно измененных клеток на 49,5%, на фоне снижения доли апоптотически измененных нейронов в 1,8 раза, достоверно превосходя группу контроля ($p < 0,05$).

Таблица 3
Плотность апоптотических и деструктивно измененных клеток IV–V слоев коры головного мозга крыс с экспериментальной ишемией, $M \pm m$

Экспериментальные группы	Плотность клеток на 1 мм ²	Доля апоптотических клеток, %
Ложнооперированные животные (n=10)	102±10	5,51±0,54
Животные с ОНМК (n=6)	211±13	14,2±1,2
Животные с ОНМК + L-лизина эсцинат (n=8)	151±17*	14,3±1,6
Животные с ОНМК + лизиний (n=9)	101±3*	5,01±0,21*
Животные с ОНМК + тиотриазолин (n=8)	170±8*	8,00±0,84*
Животные с ОНМК + парацетам (n=5)	600±16*	28,77±1,33*

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

В результате проведенного экспериментального исследования получены данные о высокой нейропротективной активности соединений L-лизина. Наибольшую активность по степени влияния на площадь, плотность и содержание РНК в нейронах и глиоцитах проявило соединение «Лизиний», достоверно превосходя группу контроля. Необходимо также отметить, что введение исследуемого препарата приводит к значительному уменьшению явлений апоптоза, о чем свидетельствуют полученные в ходе эксперимента данные. По-нашему мнению, такая высокая активность нового соединения «Лизиний» обусловлена наличием в его структуре как L-лизина, так и 1,2,4-триазола-5-тиоацетата, что дает возможность оказывать влияние на все этапы нейродеструкции в условиях церебральной ишемии.

ВЫВОДЫ

Моделирование ОНМК на 4 сутки приводит к уменьшению плотности, площади и содержания РНК в нейронах и глиальных клетках, а также увеличивает количество нейродеструктивных и апоптотически измененных клеток.

Включение в экспериментальную терапию потенциального препарата «Лизиний» значительно уменьшало морфофункциональные изменения нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры, вызванные церебральной ишемией по таким показателям, как плотность нейронов и глиальных клеток, содержание в них РНК, уменьшение плотности не-



критически и апоптически измененных клеток.

«Лизиний» по всем изучаемым показателям, характеризующим выживаемость нейронов, превосходит референс-препараты – тиотриазолин, L-лизина-эсцинат и пирацетам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рациональная нейротропная терапия / И.Ф. Беленичев, В.И. Черный, Ю.М. Колесник [и др.]. – Донецк: ИД Заславский А.Ю., 2009. – 262 с.
2. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. – М.: Медицина, 2003. – 328 с.
3. Гусев Е.И. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной церебральной ишемии и нейропротективная терапия в остром периоде ишемического инсульта / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, Е.Ю. Журавлева // Международный медицинский журнал. – 1999. – №1. – С. 54–51.
4. Григорова И.А. Патогенетические механизмы ишемического церебрального инсульта / И.А. Григорова // Лікарська справа. – 1998. – №1. – С. 58–65.
5. Беленічев І.Ф. Функціональні і патобіохімічні зміни мозкової тканини за умов експериментальної ішемії та їх корекції сумішшю тіотриазоліну та пірацетаму / І.Ф. Беленічев, І.А. Мазур, В.Р. Стець // Фізіол. журн. – 1998. – Т. 44, №3. – С. 16–19.
6. Беленічев І.Ф. Продукти вільнорадикального окислення та методи їх ідентифікації (огляд літератури) / І.Ф. Беленічев, Е.Л. Левицький, Ю.І. Губський [та ін.] // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – №4. – С. 9–14.
7. Хижняк А.А. Участие возбуждающих аминокислотных транмиттеров в механизмах нейродеструкции и перспективные методы патогенетической коррекции / А.А. Хижняк, С.В. Курсов // Біль, знеболювання, інтенсивна терапія. – 2003. – №1. – С. 43–51.
8. Сергеев П.В. Рецепторы физиологически активных веществ / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский, В.И. Петров. – Волгоград: «Семь ветров», 1999. – 640 с.
9. Якушев В.С. Принципы метаболической коррекции и регуляции энергетического обмена мозга / В.С. Якушев. – Запорожье, 1987. – 29 с.
10. Гусев Е.И. Терапия ишемического инсульта / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, И.А. Платонова // Consilium Medicum. – 2003. – Т. 5, №8. – С. 21–29.
11. Северьянова Л.А. Нейротропные эффекты L-лизина у крыс / Л.А. Северьянова, И.И. Бобыщев, М.Е. Долгинцев // Сб. тр. 71-й науч. конф. КГМУ и сес. ЦНЦ РАМН «Университетская наука: взгляд в будущее» – Курск, 2006. – Т. 1. – С. 12–13.
12. Долгинцев М.Е. Влияние аминокислоты L-лизина на различные виды боли / М.Е. Долгинцев // Материалы XI межвуз. конф. молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии». – СПб., 2005. – С. 18–20.
13. Черный В.И. Острая церебральная недостаточность / В.И. Черный, В.Н. Ельский, Г.А. Городник [и др.] – Донецк: «ИПП «Промінь», 2007. – 514 с.
14. Спасіченко П.В. Лікувальні можливості препарату «L-лізину есцинат» у комплексній терапії хворих з черепномозковою травмою / П.В. Спасіченко // Медицина залізничного транспорту України. – 2003. – №4. – С. 60–64.
15. Тиотриазолин: фармакологические аспекты и клиническое применение / И.А. Мазур, Н.А. Волошин, И.С. Чекман [и др.]. – Запорожье, Львов: 2005. – 156 с.
16. Беленичев И.Ф. Антиоксидантный механизм нейропротективного действия производных L-лизина в условиях острого нарушения мозгового кровообращения / И.Ф. Беленичев, А.А. Егоров, И.А. Мазур // Запорож. мед. журн. – 2009. – Т. 11, №6. – С. 48–51.
17. Егоров А.А. Состояние энергетического обмена при остром нарушении мозгового кровообращения и его модуляция производными L-лизина / А.А. Егоров, И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур [и др.] // Патология. – 2010. – Т. 7, №1 – С. 38–42.
18. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 527 с.
19. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. – М.: Изд-во иностр. литературы, 1962. – 962 с.
20. Scimemi A. Anchors aweigh: NMDA receptors set sail from their presynaptic port / A. Scimemi // J. Physiol. – 2008. – №7. – P. 586–588.
21. Kolesnik Y.M. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement / Y.M. Kolesnik, A.V. Abramov // Microscopy and Analysis. – 2002. – №5. – P. 12–16.