

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНОГО АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ РЕПЕРFUЗИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ МОЗГА

Л. М. Макарова, В. Е. Погорельый¹

В опытах на кошках после острой ишемии мозга проведено изучение нейропротекторного действия фосфорилированного производного аспарагиновой кислоты ПИР 87-6-0 в сравнении с винпоцетином. ПИР 87-6-0 при терапевтическом введении более эффективно, чем препарат сравнения винпоцетин, препятствует реперфузионным повреждениям мозга: ослабляет постишемическую гипергликемию, активирует утилизацию мозгом кислорода и глюкозы, подавляет постишемический метаболический лактатацидоз.

Ключевые слова: ПИР 87-6-0 [ди-(3-диметоксифосфорилпропил)овый эфир N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты], винпоцетин, ишемия мозга, реперфузия, постишемический период, лактат-ацидоз.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что при ишемических повреждениях мозга происходит интенсивное высвобождение возбуждающих аминокислот (ВАК) из нейронов, а обратный захват их пресинаптическими окончаниями нарушен из-за недостатка энергии, необходимой для работы транспортных систем [3, 6, 7, 9]. Поэтому одной из попыток воздействовать на это патогенетическое звено ишемического повреждения мозга является блокада NMDA-рецепторов. В настоящее время накоплен материал о церебропротекторных свойствах некоторых антагонистов ВАК-ергических рецепторов. Однако выраженность нежелательных побочных эффектов психотропного характера не позволяет рассчитывать на использование этих соединений в медицинской практике. В связи с этим обсуждается вопрос о возможности преодоления нежелательных эффектов агонистов и антагонистов путем использования частичных агонистов [1, 10]. В НИИ фармакологии Волгоградской медицинской академии ведется работа по целенаправленному синтезу новых производных ВАК (N-ацил- и N-алкилпроизводных фосфорилированных сложных эфиров), хорошо проникающих в мозг и обладающих выраженным нейротропным действием. Эффективность применения фосфорилированных производных ВАК в качестве ноотропных средств позволяет рассматривать их и в качестве потенциальных корректоров ишемической патологии ЦНС [2].

Оценку эффективности ПИР 87-6-0 [ди-(3-диметоксифосфорилпропил) овый эфир N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты] при острой ишемии мозга проводили в сравнении с винпоцетином, выпускаемым фирмой “Gedeon Richter” под названием кавинтон.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на кошках массой 3 – 4 кг в условиях аутогемоперфузии мозга стабильным объемом крови. Для наркоза использовали уретан (500 мг/кг) и хлоралозу (50 мг/кг), коагуляцию крови предотвращали введением гепарина (500 ЕД/кг). Стабильную вентиляцию легких поддерживали аппаратом искусственного дыхания ВИТА-1. Оптимальный режим вентиляции легких устанавливали под контролем рН, рО₂ и рСО₂ артериальной крови микроанализатором крови Radelkis. Ишемию мозга моделировали путем билатеральной окклюзии сонных артерий в течение 15 мин на фоне системной артериальной гипотензии до 40 мм рт. ст. [12, 13]. Кровь брали из сонной артерии, венозную — из стока венозных синусов. В микропробах крови через 15, 60 и 120 мин после острой ишемии головного мозга определяли рО₂, содержание глюкозы — глюкозооксидазным методом (реактив Фотоглюкоза ООО “Импакт”). Содержание пировиноградной кислоты в крови определяли модифицированным методом Умбрайт [5], молочной кислоты — по Балоховскому — Наточину [9]. Энергетический обмен мозга оценивали по показателям “потребление” кислорода, глюкозы и молочной кислоты мозгом, “избыток лактата”, по соотношению “лактат/пируват” [6].

Эксперименты проводили на 3 группах животных (в каждой по 12 животных): контроль (физиологический раствор); животные, которым вводили ПИР 87-6-0 в дозе 20 мг/кг, и животные, которым вводили препарат сравнения винпоцетин в дозе 5 мг/кг. Соединение и препарат вводили внутривенно терапевтически (сразу после ишемии).

Статистическую обработку результатов проводили внутри серий по *t*-критерию Стьюдента, между сериями — по критерию инверсий Вилкоксона-Манна-Уитни [12].

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. М. Н. Ивашев) Пятигорской государственной фармацевтической академии, Пятигорск, 357532, пр. Калинина, 11.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной серии опытов на 15 мин реперфузии в венозной крови наблюдается существенное уменьшение потребления кислорода мозгом в среднем на $55,7 \pm 3,6\%$ (таблица). Известно, что снижение поступления в клетки кислорода стимулирует гликолитическое энергообразование [4, 6, 7] приводящее к ускоренному расходу запасов гликогена и увеличению концентрации в крови глюкозы и молочной кислоты. В наших опытах увеличение в венозной крови глюкозы относительно исходных величин на 15-й минуте постишемического периода составляло $60,7 \pm 8,6\%$, а молочной кислоты — $316,7 \pm 16,8\%$. Наряду с выраженной постишемической гипергликемией снижается усвоение глюкозы мозгом на $50,7 \pm 8,2\%$, что свидетельствует об отсутствии условий для проникновения глюкозы в клетку — дефиците АТФ и нарушении нормальной функции натрий-калиевого насоса [6, 7]. Выраженное нарушение метаболизма в мозге в период реперфузии наблюдалось до конца эксперимента (см. таблицу).

Терапевтическое введение ПИР 87-6-0 в условиях острой ишемии мозга ограничивает лактат-ацидоз, гипергликемию и накопление пировиноградной кислоты

в крови, оттекающей из мозга, а также способствует увеличению потребления глюкозы и кислорода мозгом (см. таблицу).

Винпоцетин вызывает аналогичные изменения, но в отличие от соединения препятствует повышению уровня лактата в венозной крови в сравнении с контрольными опытами лишь на 15 – 60-й минутах реперфузии. Следует отметить, что при введении винпоцетина, концентрация лактата в крови, оттекающей из зоны ишемии, достоверно выше концентрации данного метаболита при введении ПИР 87-6-0. Значительное повышение концентрации молочной кислоты в венозной пробе в опытах с винпоцетином связано с резкой активацией утилизации глюкозы мозгом.

Анализ экспериментальных данных свидетельствует, что винпоцетин, в отличие от ПИР 87-6-0, не только не способствует снижению накопления пирувата в крови, оттекающей из зоны ишемии, но даже приводит к более выраженному накоплению данного метаболита по сравнению контрольной группы (см. таблицу). Уменьшение концентрации пировиноградной кислоты в венозной крови по сравнению с контролем свидетельствует об активации аэробного окисления глюкозы под влиянием соединения.

Влияние терапевтического введения ПИР 87-6-0 и винпоцетина на показатели энергетического обмена ишемизированного мозга

Условия эксперимента	Исходные значения	Изменения показателей (%) в постишемическом периоде		
		15 мин	60 мин	120 мин
<i>Содержание глюкозы в венозной крови, ммоль/л</i>				
Контроль	$7,6 \pm 0,4$	$+60,7 \pm 8,6^{\Gamma}$	$+68,3 \pm 7,9^{\times}$	$+77,3 \pm 8,4^{\times}$
ПИР 87-6-0	$12,8 \pm 3,0$	$+12,0 \pm 3,0^{*\times}$	$+6,4 \pm 3,2^{\times\#}$	$+3,7 \pm 4,1^{\#\times}$
Винпоцетин	$9,2 \pm 0,6$	$+27,2 \pm 8,3^{*\times}$	$+24,0 \pm 5,5^{*\times}$	$+49,2 \pm 13,2^{\times}$
<i>“Потребление” глюкозы мозгом, ммоль/л/100 г/л</i>				
Контроль	$63,8 \pm 6,2$	$-50,7 \pm 8,2^{\times}$	$-35,2 \pm 8,7^{\times}$	$-36,5 \pm 8,9^{\times}$
ПИР 87-6-0	$53,3 \pm 1,7$	$+12,0 \pm 7,0^{\#\times}$	$+14,4 \pm 8,8^{\#\times}$	$+13,1 \pm 8,2^{\#\times}$
Винпоцетин	$78,3 \pm 10,2$	$+119,0 \pm 8,1^{\times*}$	$+143,3 \pm 6,7^{\times*}$	$+107,4 \pm 9,6^{\times*}$
<i>Насыщение кислородом венозной крови, %</i>				
Контроль	$84,7 \pm 1,7$	$+7,5 \pm 2,0^{\times}$	$+5,5 \pm 1,9^{\times}$	$+5,5 \pm 1,8^{\times}$
ПИР 87-6-0	$71,3 \pm 1,0$	$-5,6 \pm 0,6^{*\times}$	$-16,3 \pm 2,4^{*\times}$	$-20,0 \pm 2,1^{*\times}$
Винпоцетин	$61,0 \pm 2,7$	$-4,3 \pm 5,1$	$-5,8 \pm 5,2^*$	$-12,4 \pm 3,3^{*\times}$
<i>“Потребление” кислорода мозгом, мл/100 г/мин</i>				
Контроль	$1,6 \pm 0,2$	$-55,7 \pm 3,6^{\times}$	$-40,8 \pm 5,7^{\times}$	$-42,5 \pm 6,4^{\times}$
ПИР 87-6-0	$2,6 \pm 0,1$	$+16,5 \pm 1,6^{\times\#\times}$	$+48,9 \pm 7,2^{*\times}$	$+60,5 \pm 5,5^{*\times}$
Винпоцетин	$3,2 \pm 0,3$	$+5,2 \pm 4,9^*$	$+33,0 \pm 6,2^{*\times}$	$+71,0 \pm 5,5^{*\times}$
<i>Содержание пировиноградной кислоты в венозной крови, мкмоль/л</i>				
Контроль	$281,3 \pm 9,8$	$+27,2 \pm 7,1^{\times}$	$+47,7 \pm 17,6^{\times}$	$+37,2 \pm 8,6^{\times}$
ПИР 87-6-0	$470,4 \pm 41,8$	$+3,8 \pm 1,2^{\times\#\times}$	$+4,6 \pm 0,8^{\times\#\times}$	$+4,3 \pm 0,9^{\times\#\times}$
Винпоцетин	$480,3 \pm 29,0$	$+77,9 \pm 2,7^{*\times}$	$+86,5 \pm 5,5^{*\times}$	$+60,7 \pm 12,8^{\times}$
<i>Содержание молочной кислоты в венозной крови, ммоль/л</i>				
Контроль	$2,0 \pm 0,03$	$+316,7 \pm 16,8^{\times}$	$+256,1 \pm 19,4^{\times}$	$+190,0 \pm 16,8^{\times}$
ПИР 87-6-0	$2,4 \pm 0,3$	$+33,7 \pm 4,8^{\times\#\times}$	$+35,6 \pm 3,7^{\times\#\times}$	$+29,6 \pm 4,2^{\times\#\times}$
Винпоцетин	$2,3 \pm 0,6$	$+142,0 \pm 32,0^*$	$+161,6 \pm 3,3^*$	$+175,7 \pm 23,9$

Примечание. Отличия статистически значимы ($p < 0,05$): \times — относительно исходного уровня; $*$ — относительно контрольных опытов; $\#$ — ПИР 87-6-0 относительно винпоцетина.

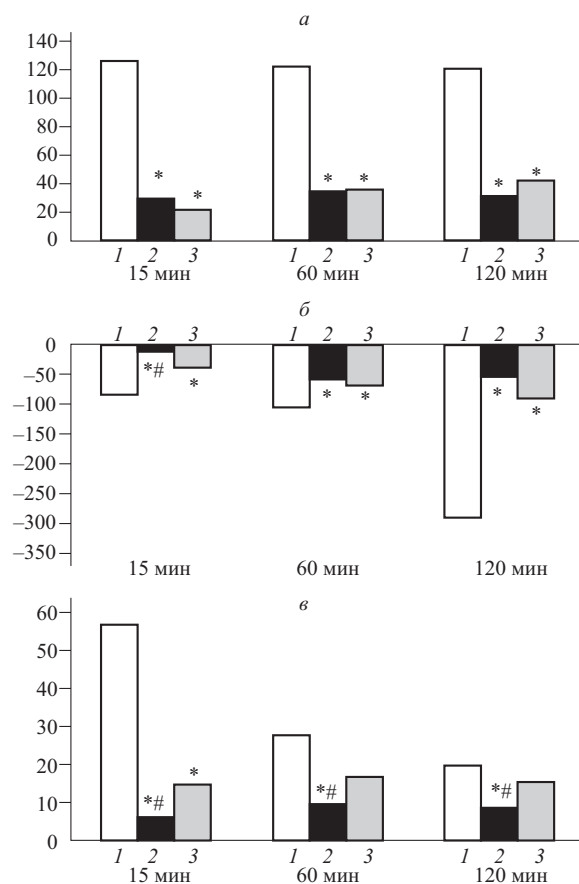
Чувствительным индексом регионарной ишемии является соотношение лактат/пируват, что послужило обоснованием оценить метаболические сдвиги в мозге с использованием данного коэффициента. В контрольной серии опытов выявлено, что в постишемическом периоде происходит значительное превалирование концентрации лактата над концентрацией пирувата. Наиболее выраженное увеличение данного коэффициента (на $127,6 \pm 11,1\%$), наблюдалось на 15-й минуте реперфузии, что связано, по-видимому, с увеличением цитоплазматического пула НАДН [4, 7]. ПИР 87-6-0 и винпоцетин в значительной степени препятствуют увеличению соотношения лактат/пируват (рисунок). Важно отметить, что если при применении ПИР 87-6-0 ограничение увеличения данного коэффициента связано как со снижением уровня молочной кислоты, так и со снижением концентрации пировиноградной, то при введении винпоцетина отсутствие существенных сдвигов со стороны данного показателя связано с тем, что винпоцетин приводит к накоплению как пирувата, так и лактата и, следовательно, при этом расчетная величина лактат/пируват из-за высокого содержания пировиноградной кислоты в крови существенно не изменяется.

Накопление лактата при гипоксических и ишемических состояниях приводит к торможению гликолитической энергопродукции [8], а одним из условий активации гликолиза и энергетики в целом является удаление молочной кислоты из ткани, которое возможно двумя путями: повышением утилизации лактата и путем увеличения кровообращения в зоне ишемии [6, 11]. Учитывая это, следующим этапом работы явилось изучение потребления данного метаболита мозгом. В контрольной серии опытов отмечено, что, несмотря на выраженный лактат-ацидоз в реперфузионном периоде, наблюдается прогрессирующее падение утилизации лактата мозгом (на $287,1 \pm 31,3\%$) (см. рисунок, б).

Введение ПИР 87-6-0 в течение всего наблюдаемого реперфузионного периода препятствует падению утилизации молочной кислоты мозгом. Менее выраженное, чем при введении соединения ПИР 87-6-0, ограничение угнетения утилизации лактата мозгом в реперфузионном периоде выявлено и при применении винпоцетина.

Известно, что при ишемии равновесие в лактатдегидрогеназной системе нарушается, приводя к избыточному образованию молочной кислоты [4, 6]. Поэтому для определения характера накопления данного метаболита, образующегося вследствие ишемии головного мозга, был определен показатель “избыток лактата”.

В контрольной серии опытов ишемия головного мозга приводит к резкому увеличению показателя “избыток лактата” в течение всего периода наблюдения (см. рисунок, в). Введение ПИР 87-6-0 в значительной степени препятствует нарушению равновесия в лак-



Динамика изменений показателей лактат/пируват (а), потребление лактата мозгом (б) и избыток лактата (в) в постишемическом периоде на фоне терапевтического применения ПИР 87-6-0 и винпоцетина.

По оси абсцисс время постишемического периода; по оси ординат - изменения показателей относительно исходных, %.

Изменения статистически значимы ($p < 0,05$): * — относительно контрольных опытов; # — ПИР 87-6-0 относительно винпоцетина. 1 — контроль, 2 — ПИР 87-6-0, 3 — винпоцетин.

татдегидрогеназной системе, эффективно ограничивая повышение показателя “избыток лактата” на 15 – 120-й минутах реперфузии, а винпоцетин препятствует накоплению исследованного метаболита в мозге лишь в первый час реперфузии.

Проведенное исследование свидетельствует, что применение ПИР 87-6-0 и винпоцетина включает промежуточные продукты каскадов биохимических реакций в биоэнергетическое обеспечение организма через глюконеогенез.

Лимитирование развития лактат-ацидоза в постишемическом периоде на фоне ПИР 87-6-0 свидетельствует об улучшении метаболических процессов в мозге, так как накопление молочной кислоты способствует дилатации капилляров (феномен “расширения сосудистого пространства”) и увеличению депонирования в них крови [7, 9, 12]. В связи с этим ПИР 87-6-0 можно охарактеризовать как средство, способствующее при острой ишемии мозга не только мобилизации

гликолитических процессов в мозге, но и поддерживающее аэробное окисление глюкозы.

Проведенные исследования свидетельствуют, что соединение ПИР 87-6-0 является эффективным потенциальным противоишемическим средством и указывает на перспективность дальнейшего поиска в ряду производных аспарагиновой кислоты.

ВЫВОДЫ

1. Терапевтическое применение ПИР 87-6-0 существенно ограничивает реперфузионные нарушения метаболизма мозга: препятствует гипергликемии, способствует утилизации глюкозы и кислорода мозгом, нивелирует постишемический лактат-ацидоз.

2. Применение ПИР 87-6-0 способствует нормализации энергетического обмена в ишемизированном мозге и превосходит по выраженности действия нейропротекторный эффект винпоцетина.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ю. Беспалов, Э. Э. Звартау, *Фармакология блокатор NMDA-рецепторов*, Невский диалект, Санкт-Петербург (2000).
2. Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **61**(4), 3 – 9 (1998).

3. В. Е. Гмиро, С. Е. Сердюк, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(6), 3 – 8 (2000).
4. А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов, *Основы патохимии*, Элби-СПб, Санкт-Петербург (2000).
5. В. С. Камышников, *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике*, Т. 1 – 2, Беларусь, Минск (2000).
6. *Клиническая биохимия*, В. А. Ткачук (ред.) ГЭОТАР-МЕД, Москва (2002).
7. Г. Н. Крыжановский, *Патофизиология нервной системы*, Москва (1997).
8. Л. Д. Лукьянова, *Бюл. экспер. биол.*, **124**(9), 244 – 254 (1997).
9. Р. С. Мирзоян, *Экспер. и клин. фармакол.*, **58**(4), 3 – 7 (1995).
10. В. И. Петров, А. П. Григорьев, *Возбуждающие аминокислоты*, Волгоград (1997).
11. В. Е. Погорельый, М. Д. Гаевый, Е. Д. Давидов и др. *Бюл. экспер. биол.*, № 12, 240 – 242 (1995).
12. В. Е. Погорельый, *Автореф. дис. д-ра биол. наук*, ст. Купавна (2001).
13. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000).

Поступила 28.05.03.

NEUROPROTECTOR ACTION OF AN ASPARAGIC ACID DERIVATIVE DURING THE MODEL REPERFUSIVE CEREBRAL DAMAGE IN CATS

L. M. Makarova and V. E. Pogorelyi

Pharmacology Department, State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk, pr. Kalinina 11, 357532 Russia

Neuroprotector properties of a new phosphorylated derivative of asparagic acid (PIR 87–65–0) were studied on a model of acute brain ischemia in cats. PIR 87–65–0 has proved to be more effective than the reference drug vinpocetin in preventing the reperfusion damage, which was manifested by decreased postischemic hyperglycemia, activated utilization of oxygen and glucose in the brain, and suppressed postischemic metabolic lactate acidosis.