

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ — НЕЙРОГЛУТАМА ПРИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У КРЫС

И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Д. А. Бакулин, Е. В. Волотова¹

Изучено нейропротекторное действие нового производного глутаминовой кислоты — соединения нейроглутама — в условиях обратимой фокальной ишемии мозга у крыс. Нейропротекторное действие соединения оценивали по способности уменьшать выраженность неврологического дефицита (на 1, 2, 3, 5 и 7 сут), нарушений мелкой моторики передних конечностей (в «лестничном» тесте), моторики задних конечностей (в тесте «сужающаяся дорожка») и объем зоны инфаркта на 7 сут после моделирования патологии. Показано, что нейроглутам при внутрибрюшинном ежедневном введении в течение 7 сут в дозе 26 мг/кг уменьшает объем зоны некроза мозговой ткани в среднем на 38 % ($p < 0,05$) и снижает выраженность моторных нарушений у животных, перенесших фокальную ишемию мозга, что свидетельствует о наличии у данного соединения нейропротекторных свойств.

Ключевые слова: фокальная ишемия головного мозга; нейроглутам; моторные навыки передних конечностей; лестничный тест; тест сужающаяся дорожка; объем зоны инфаркта; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Церебральный инсульт в большинстве развитых стран занимает первое место в ряду причин стойкой утраты трудоспособности в результате развития выраженных неврологических и когнитивных нарушений. Социальные последствия инсульта тяжелы: 70–80 % больных становятся инвалидами, причем 20–30 % из них нуждаются в постоянном уходе. В зависимости от тяжести перенесенного инсульта наблюдаются разной степени выраженности изменения всех сфер психики человека, которые коренным образом меняют качество жизни, затрагивают его личность, усугубляя тем самым его соматическое состояние и влияя на адаптационные возможности. Сложности, с которыми сталкиваются данные больные, не ограничиваются только профессионально-трудовой сферой, затруднены все виды социальной жизнедеятельности [4]. Основной причиной столь высокого уровня инвалидизации пациентов с данной патологией в большинстве случаев являются нарушения моторных функций. В связи с этим эффективная коррекция двигательных нарушений в процессе комплексной терапии больных, выживших после инсульта, является актуальной проблемой, имеющей большое социальное и экономическое значение. С этой точки зрения несомненный интерес представляют препараты с нейропротекторным механизмом действия. Во-первых, их назначение возможно при появлении первых симптомов инсульта как на догоспитальном, так и на госпитальном этапе [6]. Во-вторых, по данным экспериментальных и клинических исследований раннее применение препаратов

данной группы значительно уменьшает размер инфаркта мозга, удлиняет период “терапевтического окна”, расширяя возможности тромболитической терапии, осуществляет защиту от реперфузионного повреждения, в совокупности улучшая исход ишемического инсульта (снижение летальности и улучшение восстановления неврологических функций) [6]. Поэтому поиск эффективных средств с нейропротекторным действием по-прежнему остается актуальной проблемой.

Ранее установлено, что в условиях недостаточности мозгового кровообращения, вызванного необратимой одномоментной окклюзией общих сонных артерий, профилактическое введение нового производного глутаминовой кислоты — соединения нейроглутама — способствует снижению летальности и уменьшению выраженности неврологических нарушений [2], сохранению мозгового кровотока на более высоком уровне и уменьшению эндотелиальной дисфункции [1]. Однако в настоящее время отсутствуют исследования, направленные на изучение нейропротекторных свойств нейроглутама при его введении в условиях фокальной ишемии и оценку способности нейроглутама восстанавливать нарушенные моторные функции. В связи с чем целью данного исследования стала оценка влияния применения нейроглутама в течение 7 сут в сравнении с церебролизинем на размер зоны некроза головного мозга, неврологический дефицит и восстановление моторных функций экспериментальных животных при фокальной ишемии, вызванной обратимой окклюзией левой средней мозговой артерии.

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

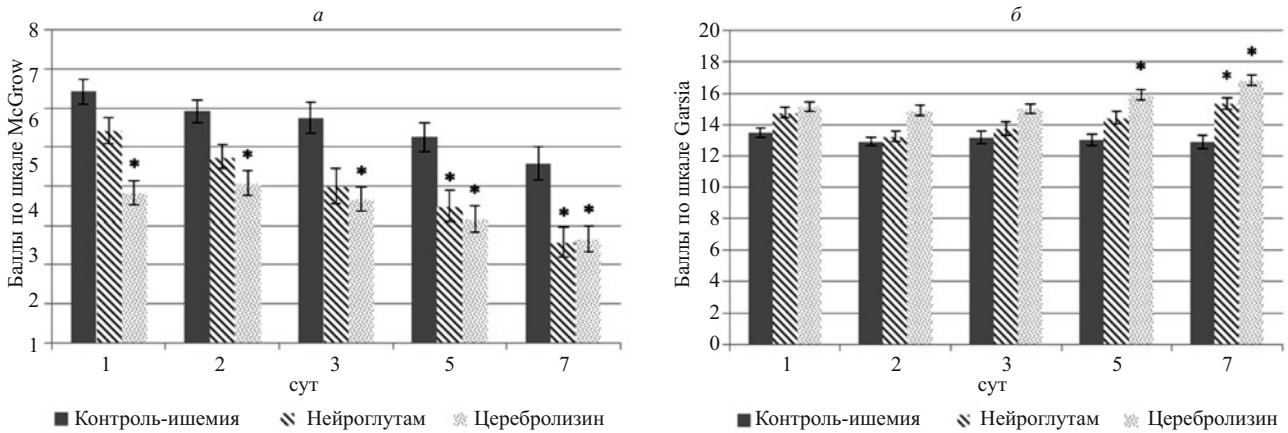


Рис. 1. Неврологический дефицит животных с фокальной ишемией в баллах по шкалам McGraw (а) и Garcia (б) в баллах ($M \pm m$).
* Достоверно относительно группы контроль-ишемия ($p < 0,05$)

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 40 беспородных белых крысах-самцах массой 250 – 270 г (питомник лабораторных животных РАН “Рапполово”), содержащихся в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на стандартной диете лабораторных животных с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и Приказу МЗ РФ от 23.08.2010 N 708н “Об утверждении правил лабораторной практики”. При проведении исследования были сформированы 4 группы по 10 животных в каждой: 1-я группа “ложнооперированные” — животным не моделировали фокальную ишемию мозга и вводили в течение 7 сут физиологический раствор; 2-я группа “контроль-ишемия” — животным моделировали фокальную ишемию, и они в течение 7 сут после опера-

ции получали физиологический раствор; 3-я группа “ишемия + нейроглутам” — животные после создания фокальной ишемии в течение 7 сут получали нейроглутам (синтезирован в Российском государственном педагогическом университете им. А. И. Герцена) в наиболее активной по результатам более ранних исследований на модели неполной ишемии головного мозга дозе 26 мг/кг [2, 5]. 4-я группа “ишемия + церебролизин” — животные после создания фокальной ишемии в течение 7 сут получали церебролизин (EVER Neuro Pharma, Австрия) в дозе 2,5 мл/кг, наиболее эффективной при фокальной ишемии головного мозга в эксперименте [13]. Первое введение физиологического раствора или исследуемых соединений выполняли через 1 ч после извлечения окклюдера из средней мозговой артерии.

Моделирование фокальной ишемии головного мозга у крыс производили обратимой окклюзией средней мозговой артерии путем внутрисосудистого введения нейлоновой нити через внутреннюю сонную артерию

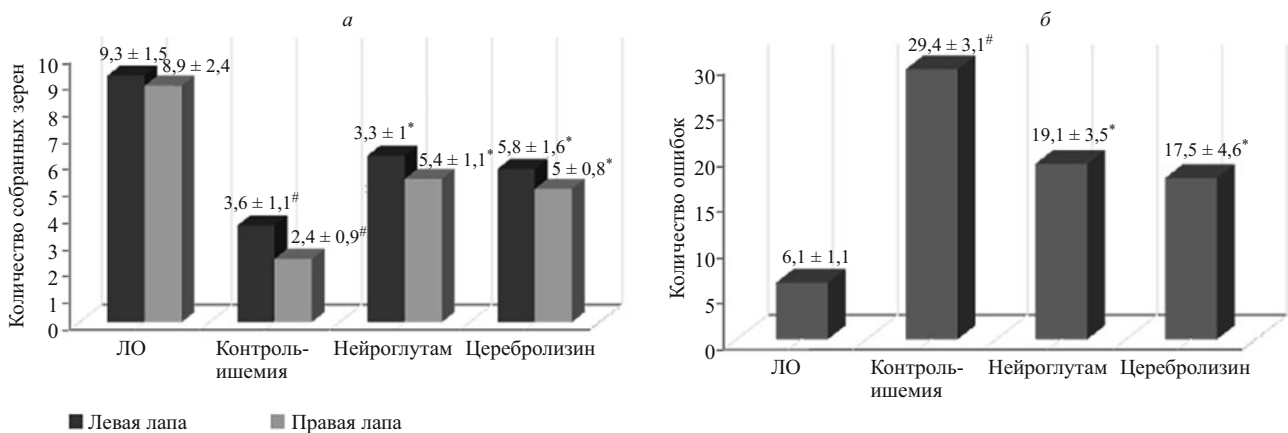


Рис. 2. Выраженность сенсомоторного дефицита крыс после окклюзии средней мозговой артерии в тесте “лестница” (число собранных зерен, а) и число ошибок в тесте “сужающаяся дорожка” (б) ($M \pm m$).

* Достоверно относительно группы контроль-ишемия ($p < 0,05$);
достоверно относительно ложнооперированной группы ($p < 0,05$).

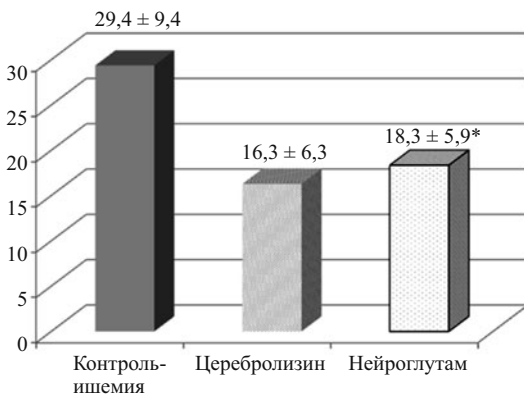


Рис. 3. Скорректированный объем зоны инфаркта левой гемисферы головного мозга после левосторонней окклюзии средней мозговой артерии (%; $M \pm m$) (100 % — объем гемисферы).

* Достоверно относительно группы контроль-ишемия ($p < 0,05$).

на глубину, перекрывающую устье отхождения средней мозговой артерии, с последующим ее излечением через 2 ч из сосуда и перевязкой внутренней сонной артерии [9, 12]. В качестве анестезии использовали хлоралгидрат в дозе 350 мг/кг.

На 1, 2, 3, 5 и 7 сут после моделирования фокальной ишемии мозга оценивали общий неврологический дефицит по шкалам McGrow [3, 7] и Garcia [11]. При использовании шкалы McGrow у животного оцениваются нарушения тонуса конечностей, а также учитывается вялость, маневренные движения (перемещение по кругу), состояние комы и летальный исход. Наибольший суммарный балл по шкале McGrow соответствует большему уровню дефицита [3]. Напротив, при использовании шкалы Garcia наибольший суммарный балл присваивается животному с наименьшим снижением двигательной активности, мышечного тонуса и чувствительности, при этом делается акцент на различие показателей сторон тела, которые находятся ипсилатерально либо контрлатерально одностороннему повреждению головного мозга [11].

Для оценки выраженности моторных нарушений, вызванных фокальной ишемией, были выбраны наиболее чувствительные и цитируемые тест системы: “лестничный” тест [8] и “сужающаяся дорожка” [14].

“Лестничный” тест представляет собой высокочувствительный тест для оценки незначительных нарушений мелкой моторики передних конечностей у экспериментальных животных. Установка для проведения лестничного теста представляет собой удлиненную камеру, имеющую внутри узкую платформу, образующую вверх небольшое свободное пространство, которое разграничивает парную лестницу с 7 ступенями. В углубления на каждой ступени помещается по две пищевые гранулы (суммарно по 14 с каждой стороны). За 6 сут до моделирования фокальной ишемии происходит обучение животных на протяжении 3 сут по 15 мин. Задачей для животного является собрать максимальное количество гранул с каждой стороны. Кон-

струкция установки не позволяет использовать обе лапы одновременно (совместно), и количество собранных зерен отражает состояние мелкой моторной функции каждой передней лапы в отдельности. Животные, не способные достать по 6 гранул с каждой стороны, исключались из эксперимента [8]. Далее следует 3-дневная процедура воспроизведения, когда осуществляли подсчет собранных гранул с вычислением среднего значения за 3 сут для каждой передней конечности. Затем этот тест повторяли на 5, 6, 7 сут после моделирования патологии. За 1 неделю до начала обучения в “лестничном” тесте вводится частичная пищевая депривация, допускающая снижение массы животных на 10 % от исходного уровня. В качестве пищевых гранул в тесте использовали обжаренные ядра семян подсолнечника.

Тест “сужающаяся дорожка” предназначен для оценки моторной функции, главным образом, задних конечностей экспериментальных животных. Установка для теста представляет собой две сужающиеся приподнятые горизонтальные планки, расположенные друг под другом. Нижняя, более широкая, образует выступы по 2 см с каждой стороны для постановки конечности в случае соскальзывания с верхней планки. Животному дается 3 попытки. В первые 2 дня происходит обучение. В первый день животное поочередно сажает один раз вблизи (10 – 15 см) от черного ящика, затем 2 раза на расстоянии 1/4 длины дорожки. Во второй день это расстояние составляет 1/4, 1/2, 3/4 длины дорожки для 3 попыток соответственно. Для дополнительной стимуляции перехода животного в темный отсек стартовая площадка освещается ярким светом. На третий день, при первом воспроизведении, крысы должны самостоятельно доходить от стартовой площадки до темной камеры, используя выступы не более 3 раз. Животных, которые не выполняли данное условие, исключали из эксперимента. Второе воспроизведение осуществляли на 7 сут после моделирования нарушения мозгового кровообращения. Процедуру тестирования записывали на видеокамеру с высоким разрешением. При анализе видеозаписи производили подсчет числа ошибочных постановок конечности на один из выступов (А), числа соскальзываний конечности на выступ (В) и общего количества шагов (N). Степень выраженности моторного дефицита (МД) рассчитывается по формуле в процентах:

$$\text{МД} = ((A + 0,5B)/N) \cdot 100 \%$$

На завершающем этапе исследования для сопоставления выраженности моторных нарушений и размера зоны некроза мозговой ткани выполняли количественную оценку размера некроза по анализу цифровых фотографий окрашенных срезов мозга [10]. Для этого изготавливали срезы больших полушарий толщиной 2 мм, которые инкубировали в 0,2 % растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида при 37 °С в тече-

ние 20 мин. После окрашивания срезы фотографировали на цифровую камеру в одной плоскости с миллиметровой линейкой. Измерение площади окрашенной и неокрашенной ткани осуществляли при помощи программного обеспечения ImageJ. Для избежания возможного завышения площади некротической ткани вследствие отека учитывали скорректированный объем зоны инфаркта (ЗИ), который рассчитывали в процентах относительно объема интактной гемисферы по упрощенной формуле:

$$\text{ЗИ} = ((V - (A - C))/V) \cdot 100 \%,$$

где A — суммарная площадь пораженных гемисфер на срезах (мм^2), V — суммарная площадь интактных гемисфер на срезах (мм^2), C — суммарная площадь зон инфаркта на срезах (мм^2).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программ Microsoft Excel 2007 и BioStat 2008. Использовали критерии Шапиро-Уилка, Краскела-Уоллиса и критерия Данна. Статистически значимыми признавали различия при $p < 0,05$. Данные представлены в формате $M \pm m$, где M — средняя арифметическая, m — ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании фокальной ишемии путем интравазальной окклюзии у животных развивался неврологический дефицит разной степени тяжести (рис. 1, а, б).

Так у животных группы “контроль” через 24 ч после операции регистрировали выраженный неврологический дефицит, который сохранялся в течение 7 сут наблюдения. Введение исследуемых соединений приводило к сглаживанию неврологических симптомов. При этом позитивное действие нейроголутама было несколько отсрочено (в первые сутки после моделирования фокальной ишемии церебролизин, по сравнению с нейроголутамом, более выражено сглаживал неврологические нарушения), однако к концу 7 сут наблюдения средний балл неврологического дефицита по шкалам McGrow и Garcia сопоставим с таковым у церебролизина и был достоверно меньше, чем в контрольной группе (рис. 1).

При оценке двигательных нарушений отмечено, что по результатам проведенного “лестничного” теста фокальная ишемия головного мозга вызвала значительное ухудшение мелкой моторики передних конечностей у животных с обеих сторон (рис. 2, а, б).

Левой конечностью животное было способно поднимать корм с первых 3–4 ступеней, а правой — пищу поднимали только с 2 верхних ступеней. Результаты теста “сужающаяся дорожка” также свидетельствуют о значительном ухудшении двигательной функций животных и нарушении координации движения. Так в группе “контроль-ишемия” достоверно возрастало число ошибок в момент движения по дорожке, и удли-

нялось время прохождения теста по отношению к группе ложнопериоперированных животных (рис. 2, б).

Животные, получавшие нейроголутам и церебролизин, меньше совершали ошибок в тесте “сужающаяся дорожка”, что свидетельствует о нейропротекторном действии указанных препаратов. Число собранных зерен в тесте “лестница” также достоверно отличалось от показателей группы “контроль-ишемия”.

Окраска извлеченного после декапитации мозга животных 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом и последующий планиметрический анализ зоны некроза показал, что у животных, получавших нейроголутам и церебролизин, размеры зоны некроза мозга были значительно меньше по сравнению с таковыми у животных контрольной группы (рис. 3).

Известно, что при церебральной ишемии наблюдается повышение концентрации глутамата, в результате чего происходит мобилизация ионов кальция из внутриклеточного депо, опосредованная как NMDA-рецепторами, так и не NMDA-рецепторами. Избыточное накопление кальция внутри клетки в ишемизированных нейронах за счет связывания с кальмодулином вызывает активацию клеточных ферментов (протеинкиназ, липаз, нуклеаз), обуславливающих образование NO, свободных радикалов, разрушение внутриклеточных белков, фосфолипидов, нуклеиновых кислот. Комбинация этих патобиохимических процессов приводит к гибели нейронов путем как некроза, так и апоптоза [3, 4, 6]. Исследуемое нами соединение нейроголутама является производным глутаминовой кислоты и, возможно, в условиях церебральной ишемии, с одной стороны, действует как конкурентный антагонист NMDA и AMPA рецепторов, тем самым противодействуя различным проявлениям ишемии мозговой ткани, вызванной обратимой окклюзией левой среднемозговой артерии. С другой стороны, нейропротекторный эффект нейроголутама может быть обусловлен активацией метаболитных глутаматных рецепторов, которые обеспечивают медленную реакцию на глутаматергические сигналы и при активации которых происходит повышение экспрессии 2 изоформ фосфолипаз, защищающих нейроны от оксидативного стресса.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что соединение нейроголутама, являющееся производным глутаминовой кислоты, оказывает выраженный, сопоставимый с церебролизином, нейропротекторный эффект, заключающийся в уменьшении зоны некроза мозговой ткани и выраженности неврологического дефицита и моторных нарушений, вызванных фокальной ишемией у крыс.

ВЫВОД

Нейроголутам в дозе 26 мг/кг при внутрибрюшинном введении ежедневно в течение 7 сут вызывает у животных, перенесших фокальную ишемию мозга, уменьшение зоны некроза мозговой ткани в среднем на 38 % ($p < 0,05$), а также снижение выраженности

моторных нарушений передних и задних конечностей в среднем в 2 и 1,5 раза соответственно ($p < 0,05$). Нейропротекторный эффект нейроглутама в условиях экспериментальной фокальной ишемии у крыс сопоставим с таковым у препарата церебролизин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Волотова, Д. В. Куркин, Н. В. Мазина и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **76**(6), 11 – 13 (2013).
2. Е. В. Волотова, Н. В. Мазина, Д. В. Куркин, И. Н. Тюренков, *Вестн. Волгоград. гос. мед. университета*, № 1, 40 – 42 (2013).
3. И. В. Ганнушкина, *Журн. невропатол. и психиатр.*, № 1, 14 – 18 (1996).
4. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, М. Ю. Мартынов, П. Р. Камчатнов, *Вестн. РГМУ*, **51**(4), 28 – 32 (2006).
5. В. И. Петров, И. Н. Тюренков, В. В. Багметова и др., Патент РФ № 242983RU, *Бюл. изобрет.*, № 27 (2011).
6. В. И. Скворцова, Н. В. Ефремова, Н. А. Шамалов и др., *Качество жизни, Медицина*, **13**(2), 35 – 41 (2006).
7. И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова и др., *Сиб. мед. журн. (Иркутск)*, **115**(8), 61 – 63 (2012).
8. A. L. Baird, A. Meldrum, S. B. Dunnett, *Brain Res. Bul.*, **54**(2), 243 – 250 (2001).
9. L. Belayev, O. F. Alonso, R. Busto, et al., *Stroke*, **27**(9), 1616 – 1623 (1996).
10. V. H. Brait, K. A. Jackman, A. K. Walduck, et al., *J. Cerebral Blood Flow Metabol.*, **30**(7), 1306 – 1317 (2010).
11. J. H. Garcia, S. Wagner, K. F. Liu, et al., *Stroke*, **26**(4), 627 – 634 (1995).
12. Z. E. L. Longa, P. R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins, *Stroke*, **20**(1), 84 – 91 (1989).
13. J. Ren, D. Sietsma, S. Qiu, et al., *Restorative Neurol. Neurosc.*, **25**(1), 25 – 31 (2007).
14. T. Schallert, *NeuroRx*, **3**(4), 497 – 504 (2006).

Поступила 04.07.14

STUDYING THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF THE NOVEL GLUTAMIC ACID DERIVATIVE NEIROGLUTAM ON FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS

I. N. Tyurenkov, D. V. Kurkin, D. A. Bakulin, and E. V. Volotova

Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, 400131 Russia

We have studied the neuroprotective effect of the novel glutamic acid derivative neuroglutam on reversible focal cerebral ischemia in rats. The neuroprotective drug action was assessed by the ability to reduce the severity of neurological deficit (1, 2, 3, 5 and 7 days), forelimb fine-motor disorders (in the ladder test), hind limb motor activity (beam-walking test), and volume of the infarct zone upon 7-day pathologic exposure. It was found that the therapeutic administration of neuroglutam (26 mg/kg, i.p., for 7 days) reduces the volume of necrosis of cerebral tissues in case of focal brain ischemia in animals (on the average by 38%, $p < 0.05$) and decreases the severity of motor disorders, which indicates the presence of neuroprotective effect of this compound.

Keywords: focal cerebral ischemia; neuroglutam; forelimb motor skills; staircase test; beam-walking test; infarct volume; rats