

Наиболее лабильной структурой в отношении заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, являются N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]-бензимидазолы (максимальный супремальный показатель 0,36). Также весьма восприимчивой к повышению гипогликемической активности, путем введения соответствующих заместителей, является структура N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (максимальный супремальный показатель 0,33). Остальные базовые структуры имеют более низкие величины этого параметра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного анализа методом супремальных оценок установлено, что наиболее лабильной к введению заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, является структура производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Шестакова М. В., Сунцов Ю. И. Сахарный диабет в России: проблемы и решения. — М., 2008. — С. 3—6.
2. Корн Г., Корн Т. Справочник по математике для научных работников и инженеров / Пер. с англ.; под общ. ред. И. Г. Арамановича. — 6 изд., стереотип. — СПб.: Изд-во «Лань», 2003. — 832 с.
3. Северин С. Е., Соловьева Г. А. Практикум по биохимии: Учеб. пособие. — 2-е изд., переработ. и доп. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — 509 с.
4. Larsen S. D., Connell M. A., Cudahy M. M., et al. // J. Med. Chem. — 2001. — Vol. 44(8). — P. 1217—1230.

Контактная информация

Ленская Карина Владимировна — ассистент кафедры фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: karinavl@yandex.ru

УДК 615.21:616.8

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ГЛИЦИНА И МАГНИЯ СУЛЬФАТА У КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ, ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В. Ю. Муравьева, Н. А. Гурова, Н. И. Чепляева, Е. В. Резников

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии*

Нейропротекторные свойства магния сульфата и глицина подтверждены на модели 60-минутной фокальной ишемии левой средней мозговой артерии с последующей 24-часовой реперфузией у крыс. Магния сульфат (90 мг/кг, внутривенно за 30 мин до ишемии) снижал уровень NSE на 67 %, уменьшал размеры зоны некроза в 1,9 раза, выраженность отека мозга — на 25 % и улучшал неврологическую симптоматику на 23,4 %. Глицин (800 мг/кг, внутрибрюшинно за 30 мин до ишемии) ограничивал рост концентрации NSE на 114 %, уменьшал размеры зоны некроза в 2,24 раза и степень отека мозга на 32 %, также улучшал неврологическую симптоматику на 23 %.

Ключевые слова: окклюзия левой средней мозговой артерии, глицин, магния сульфат, нейропротекция, нейронспецифическая енолаза (NSE).

COMPARATIVE ANALYSIS OF NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF GLYCINE AND MAGNESIUM SULFATE IN RATS USING MORPHOMETRIC AND ENZYME IMMUNOASSAY METHODS FOR ASSESSING NEUROLOGICAL BRAIN DAMAGE

V. U. Muravyova, N. A. Gurova, N. I. Cheplyaeva, E. V. Reznikov

Neuroprotective properties of magnesium sulphate and glycine were confirmed using the model of focal ischemia of the left middle cerebral artery followed by 24-hour reperfusion in rats. Magnesium sulfate (90 mg/kg, IV, 30 minutes before ischemia) reduced the level of NSE by 67 %, cerebral edema by 25 %, yielded a 1.9-time reduction in the necrosis zone area and improved neurological symptoms by 23,4 %. Glycine (800 mg/kg, IP, 30 minutes before ischemia) suppressed an increase in the NSE concentration by 114 %, yielded a 2.24-time reduction in the necrotic zone area and decreased the degree of cerebral edema by 32 %, and improved neurological symptoms by 23 %.

Key words: occlusion of the left middle cerebral artery, glycine, magnesium sulfate, neuroprotection, neuron-specific enolase (NSE).

Поиск новых методов защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения остается приоритетной задачей. К настоящему времени разработаны и изучены в экспериментальных услови-

ях несколько десятков соединений, обладающих нейропротекторной активностью. Однако в клинической практике лечения больных с церебральным инсультом нашли применение лишь единичные препараты [8, 4].

Так, доказанным методом лечения инсульта в острой фазе остается применение естественного агониста глицинового участка NMDA-рецептора глутаматергических структур мозга глицина, а также магния сульфата, который является природным стабилизатором всех подтипов NMDA-рецепторов и контролируют работу потенциалзависимых ионных каналов Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} [4, 1].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Сравнительная оценка нейропротекторной активности глицина и магния сульфата на модели фокальной ишемии у крыс с использованием современных методов оценки повреждения головного мозга.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследования проводили в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени [3].

Эксперименты были выполнены на 50 белых беспородных крысах-самках массой 220—240 г (ООО «Питомник лабораторных животных АМТН», ветеринарное свидетельство 250 № 0469483 от 16.02.14) в условиях наркоза (хлоралгидрат 400 мг/кг).

Фокальную ишемию головного мозга моделировали с помощью эндоваскулярной окклюзии левой средней мозговой артерии (ЛСМА) по методике Koizumi J. (1986) в модификации Longa E. Z. (1989) и Belayev L. (1996) [2, 3, 6].

Животные были разделены на 5 групп: 1 — «интактные» ($n = 10$) животные без оперативного вмешательства; 2 — «ложнооперированным» ($n = 10$) животным проводили весь комплекс операций, кроме окклюзии ЛСМА; 3 — «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» ($n = 11$) животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутрибрюшинно вводили физиологический раствор за 30 мин до ишемии; 4 — «ИР+глицин» ($n = 10$) животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутрибрюшинно вводили глицин («Serva», Германия) за 30 мин до ишемии (800 мг/кг) [10]; 5 — «ИР+магний сульфат» ($n = 9$) животным с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА внутривенно вводили магний сульфат (ООО «Фармстандарт», Россия) за 30 мин до ишемии (90 мг/кг) [9].

Продолжительность ишемии составляла 60 мин, реперфузии — 24 часа. Постреперфузионное повреждение головного мозга оценивали по неврологическим нарушениям, уровню нейроспецифического маркера в сыворотке крови, размерам инфаркта и выраженности отека мозга.

Неврологическое состояние у крыс исследовали в баллах по шкале Гарсия (1995) [6, 7] с использованием дополнительных тестов по следующим показателям: двигательная активность и координация движений, мышечный тонус, чувствительность, некоторые физиологические рефлексy. Нарушения оценивали на стороне повреждения и контрлатерально. Тестирование проводили до и через 24 часа после поврежде-

ния головного мозга, рассчитывали средний балл нескольких тестов для каждого показателя.

Концентрацию нейронспецифической енолазы (NSE) в плазме крови (нг/мл) определяли иммуноферментным «сэндвич методом» при помощи коммерческого набора Rat neuron-specific Enolase (NSE) Elisa Kit фирмы CUSABIO (Китай) на универсальном микропланшетном ридере ELX 800 производства фирмы Bio-Tek Instruments, Inc (США).

Величину зоны повреждения и выраженности отека мозга оценивали методом окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолием хлоридом (ТТС) (SIGMA, США) [6]. Срезы мозга готовили во фронтальной плоскости толщиной 2 мм с помощью матрицы Alto, США. Инкубировали в 1%-м растворе ТТС при $t = 37,0^{\circ}C$ в течение 5 мин. Анализировали 5 срезов мозга, производимых во фронтальной плоскости. С помощью фотоаппарата Canon (China) получали цифровые фотографии передней и задней поверхности срезов. Затем измеряли площадь зоны некроза. Все расчеты осуществляли на компьютере с помощью графического редактора для обработки и анализа изображений программы Image J, США (imagej.ru). Процент зоны повреждения определяли по отношению площади всего среза к площади инфаркта. Степень отека мозга оценивали по асимметрии полушарий, которая выражалась в отношении площади поврежденного полушария (левого) к площади правого фронтального среза мозга.

Статистические расчеты проводили с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0, фирмы StatSoft, Inc. (США). Проводили попарное сравнение выборок с использованием U-критерия Манна-Уитни. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

Исследование проводили в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и «Правил лабораторной практики», утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 № 708н, с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [Directive 2010/63/EU]. Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета (протокол № 126-2011 от 15 февраля 2013 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях моделирования фокальной ишемии у всех животных с окклюзией ЛСМА через 24 часа наблюдали значительное повреждение головного мозга, что подтверждалось ростом уровня NSE в сыворотке крови, возникшими неврологическими нарушениями, а также морфометрическими изменениями.

Клинический синдром при тотальном инфаркте в бассейне средней мозговой артерии (СМА) складывается из контралатеральной гемиплегии, гемианестезии и гемианопсии, с преимущественным нарушением функции верхних конечностей. Поэтому выбор неврологических

тестов основывался на клинической симптоматики окклюзии в бассейне СМА.

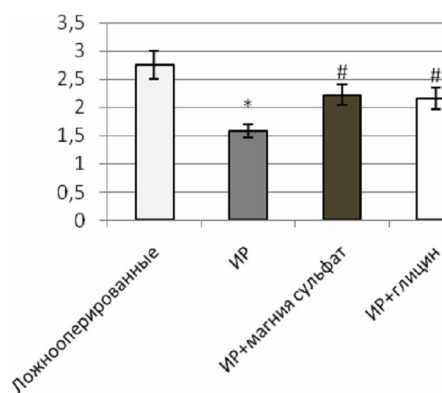
При исследовании неврологического состояния по шкале Гарсия до операции все животные «набрали» необходимый максимальный средний балл по каждому исследуемому показателю. Через сутки после операции при повторном тестировании наблюдали нарушения двигательной активности и координации движения, чувствительности, мышечного тонуса, рефлексов.

Оценка показателя двигательной активности и координации движения включала в себя следующие тесты: спонтанная двигательная активность, симметричность предплечий, симметричность движения передних конечностей и координация движения. Было выявлено, что в группе контрольных животных развились выраженные нарушения в соответствующих тестах, средний балл составил $1,58 \pm 0,12$ (рис. 1А). При однократном профилактическом применении глицина и магния сульфата наблюдали статистически значимое уменьшение выраженности нарушения двигательной активности и координации движения на 37 % по сравнению с результатами животных, которые не получали лечения.

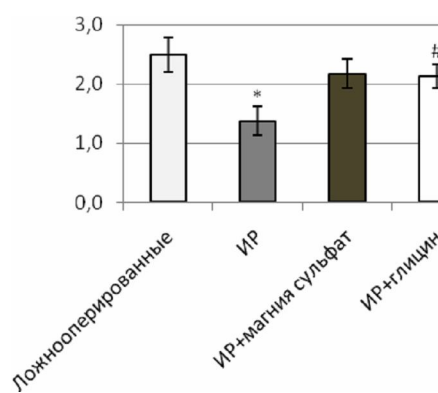
Изучение мышечного тонуса проводили с помощью следующей группы тестов: отдергивание передних конечностей, удержание на сетке, движение по вертикали и удерживание груза.

В группе контрольных животных после ишемического повреждения сформировались выраженные нарушения оцениваемого показателя ($1,37 \pm 0,24$) баллов (рис. 1Б). При применении магния сульфата и глицина наблюдали статистически значимое улучшение мышечного тонуса на 59 % ($p > 0,05$) и 56 % ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контрольной группой животных.

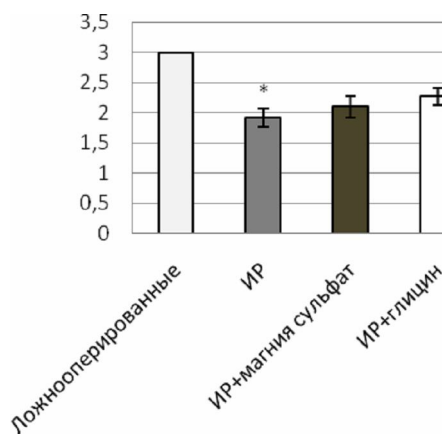
На модели эндоваскулярной окклюзии ЛСМА было изучено несколько физиологических рефлексов: реакция на звук, роговичный рефлекс, реакция на свет, болевая реакция и хватательный рефлекс. Однако наиболее информативным тестом оказался хватательный рефлекс. У животных с окклюзией ЛСМА, не получавших лечения, наблюдали статистически значимые нарушения ($1,92 \pm 0,15$) баллов по сравнению с эффектом в группе ложнооперированных (рис. 1В). Глицин и магния сульфат при профилактическом введении способствовали восстановлению хватательного рефлекса на 18 и 9 % соответственно по сравнению с результатом в контрольной группе животных ($p > 0,05$). При сравнительной оценке двух исследуемых препаратов по данному параметру было показано, что глицин оказывает более выраженное влияние в отношении восстановления соответствующего нарушения в 2 раза по сравнению с магния сульфатом, однако результаты статистически незначимы.



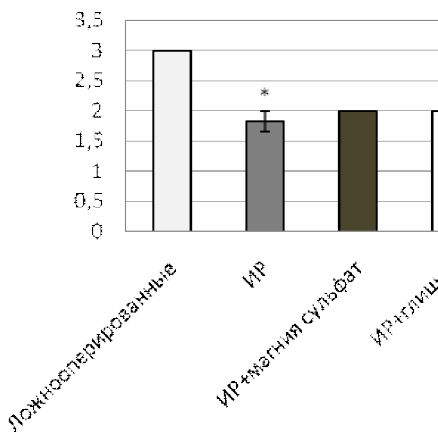
А. Двигательная активность и координация движения (среднее по 4 тестам)



Б. Мышечный тонус (среднее по 4 тестам)



В. Хватательный рефлекс



Г. Реакция на прикосновение

Рис. 1. Влияние препаратов магния сульфата и глицина на неврологический дефицит крыс с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА (шкала Гарсия)

При изучении чувствительности в тесте «реакция на прикосновение» у крыс после фокального ишемического повреждения развилось статистически значимое нарушение в контрольной группе ($1,83 \pm 0,17$) балла по сравнению с животными без патологий (рис. 1Г). Введение глицина и магния сульфата восстанавливало данный показатель на 9 % каждый ($p > 0,05$).

Расчет среднего балла по всем изученным неврологическим нарушениям показал, что эффекты магния сульфата ($2,11 \pm 0,08$) балла и глицина ($2,10 \pm 0,07$) балла превосходили результаты группы контрольных животных ($1,7 \pm 0,09$) в среднем на 23 % ($p < 0,05$). Статистически значимых различий показателей дефицита в экспериментальных группах, получавших лечение, не выявлено.

Постишемическое повреждение головного мозга способствует росту уровня NSE в биологических жидкостях. В качестве референтного значения концентрации фермента NSE использовали показатели группы интактных животных, которые сопоставимы с литературными данными ($0,34 \pm 0,16$) нг/мл [5] (табл.).

Значительное повышение уровня енолазы в плазме крови наблюдали у крыс с окклюзией ЛСМА,

не получавших лечения, в 4,03 раза по сравнению с животными без патологии ($p < 0,05$). При профилактическом введении магния сульфата и глицина было выявлено достоверное ограничение роста биомаркера на 67 и 114 % соответственно ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными. При сравнении эффектов изучаемых препаратов было выявлено, что глицин превосходил более чем на 30 % по своей активности магния сульфат, но данные статистически не значимы. После забора крови для определения маркера повреждения головного мозга и исследования неврологического дефицита проводили декапитацию и извлечение мозга для оценки зоны некроза и степени отека (рис. 2).

Наиболее обширный инфаркт мозга наблюдали у животных контрольной группы, процент зоны некроза составил $19,07 \pm 2,04$. Глицин и магния сульфат уменьшали область повреждения мозга по сравнению с ишемизированными животными, не получавшими лечения, в 2,24 и 1,9 раз соответственно ($p < 0,05$) (табл.). Различия эффектов глицина и магния сульфата составили 19 % и оказались статистически недостоверны.

Влияние препаратов магния сульфата и глицина на объем зоны некроза и оценка коэффициента асимметрии с эндоваскулярной окклюзией ЛСМА ($M \pm m$)

Группа	n	Зона некроза, Δ %	Коэффициент асимметрии, усл. ед.	NSE, нг/мл
Интактные	10	0	1,00	$0,34 \pm 0,16$
Ложнооперированные	10	0	1,00	$0,78 \pm 0,22$
Контроль-ишемия/реперфузия (ИР)	11	$19,07 \pm 2,04^{* **}$	$1,18 \pm 0,02^{* **}$	$1,37 \pm 0,15^{*}$
ИР+магния сульфат	9	$10,13 \pm 2,58^{\#}$	$1,14 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,20^{\#}$
ИР+глицин	10	$8,51 \pm 1,61^{\#}$	$1,12 \pm 0,01^{\#}$	$0,64 \pm 0,12^{\#}$

Различия статистически значимы ($p < 0,05$) по отношению к группе: *«интактные»; **«ложнооперированные», #«контроль-ишемия/реперфузия (ИР)».

Примечание. «Ложнооперированные» — животные, которым проводили весь комплекс оперативного вмешательства без окклюзии ЛСМА; «контроль-ишемия/реперфузия (ИР)» — животные, которым за 30 мин до окклюзии в/в вводили растворитель из расчета 0,1 мл на 100 г; «ИР+магния сульфат» — животные, которым за 30 мин до окклюзии в/в вводили магний сульфат в дозе 90 мг/кг; «ИР+глицин» — животные, которым за 30 мин до окклюзии в/в вводили глицин в дозе 800 мг/кг.

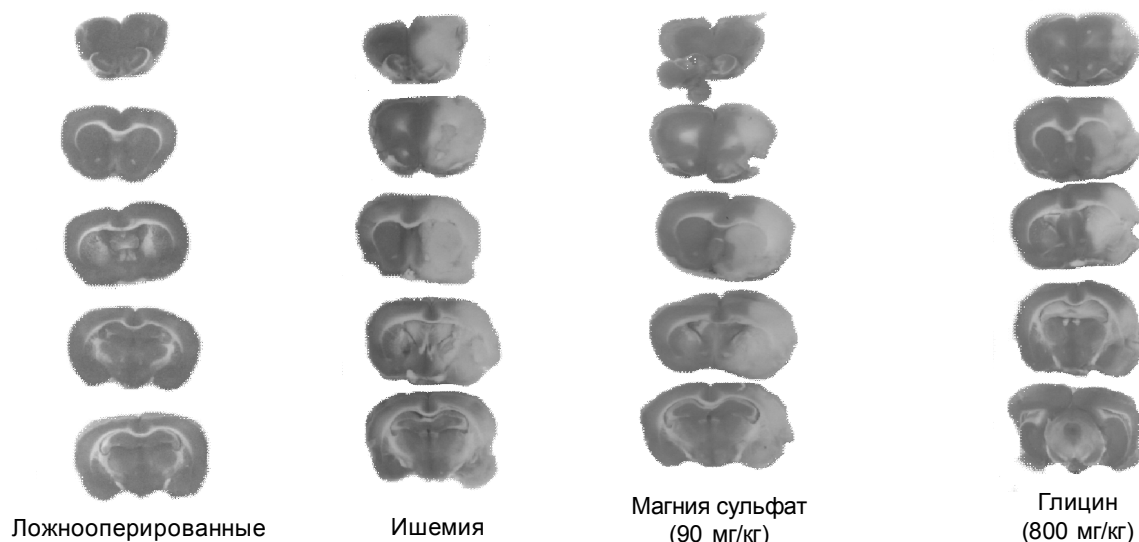


Рис. 2. Размеры повреждения головного мозга при окрашивании TTC через 24 часа после окклюзии ЛСМА

Показатели отека мозга — коэффициенты асимметрии у животных с окклюзией ЛСМА и без нее представлены в табл. Процент степени отека при лечении глицином снизился на 32 %, магнием сульфата — на 25 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели фокальной 60-минутной ишемии с последующей 24-часовой реперфузией магния сульфат (90 мг/кг, внутривенно) и глицин (800 мг/кг, внутривенно) при однократном введении за 30 мин до окклюзии ЛСМА оказывали нейропротекторное действие.

При сравнительной оценке защитных свойств исследуемых препаратов было показано, что глицин наиболее эффективно уменьшал выраженность инфаркта и отека мозга, ограничивал уровень NSE по сравнению с магнием сульфатом. При коррекции неврологических нарушений исследуемые препараты в равной степени оказывали стабилизирующее действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акарачкова Е. С., Вершинина С. В. // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. — 2013. — Т. 113, № 2. — С. 80—83.
2. Коржевский Д. Е., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. // Морфология. — 2012. — 141(2). — С. 28 - 32.
3. Мирзоян Р. С., Плотников М. Б., Ганьшина Т. С. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени: в Руковод-

стве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. — М.: Гриф и К., 2012. — С. 478—485.

4. Петров В. И., Пономарев Э. А., Маскин С. С. и др. // Экспер. и клин. фармакология. — 2011. — № 74 (8). — С. 13—16.

5. Семенов А. И., Кондрацкий Б. А., Кобеляцкий Ю. Ю. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». — 2013. — № 4. — С. 38—41.

6. Спасов А. А., Федорчук В. Ю., Гурова Н. А. и др. // Вестник НЦЭСМП. — 2014. — № 4. — С. 39—45.

7. Garcia J. H., Wagner S., Liu K.F., Hu X., et al. // Stroke. — 1995. — № 26 (4). — P. 627—634.

8. Peter A. Guidelines for Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack 2008 // The European Stroke Organization (ESO) Executive Committee and the ESO Writing Committee. [Электронный ресурс] URL: <http://www.eso-stroke.org/recommendations>. дата обращения: 20.03.2015.

9. Yang Y., Li Q., Ahmad F., Shuaib A. // Neurosci Lett. — 2000. — 285(2). — P. 119—122.

10. Yao W., Ji F., Chen Z., Zhang N., et al. // Stroke. — 2012. — 43(8). — P. 2212—2220.

Контактная информация

Гурова Наталия Алексеевна — к. м. н., старший преподаватель, докторант кафедры фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: gurova.vlgmed@mail.ru