

И. Ф. Беленичев, А. А. Егоров

Соединения L-лизина в фармакокоррекции нарушений энергетического метаболизма головного мозга при моделировании геморрагического инсульта

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, L-лизин, нейропротекция, энергетический метаболизм

Несмотря на достигнутые успехи современной нейрофармакологии, проблема разработки и создания высокоэффективных нейропротективных средств для лечения последствий геморрагического инсульта остается актуальной. Одним из основных механизмов развития нейродеструкции в условиях геморрагического инсульта является выраженный энергодефицит. Основываясь на этом, одним из перспективных направлений фармакотерапии церебральной гипоксии является поиск новых соединений, действие которых было бы направлено на восстановление биоэнергетических процессов головного мозга [1–3].

В настоящее время наиболее перспективным метаболитотропным препаратом с выраженным энерготропным и антиоксидантным эффектами является тиотриазолин, широко применяемый в клинической неврологии [4–5].

Имеется многолетний опыт успешного применения препаратов янтарной кислоты в неврологической и кардиологической практике с целью коррекции гипоксических состояний [2, 5]. В качестве базовой молекулы для создания нейропротекторов, пристальный интерес вызывает незаменимая аминокислота L-лизин, которая посредством биотрансформации в пипеколовую кислоту способна усиливать аффинность ГАМК-бензодиазепин-рецепторного комплекса [6–7].

С целью получения высокоэффективных нейропротекторов с энерготроп-

ным механизмом действия на кафедре фармацевтической химии ЗГМУ под руководством профессора И. А. Мазура были получены новые соединения – L-лизина сукцинат и L-лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат (рабочее название «Лизиний») [8–9].

Нашими предыдущими исследованиями была показана высокая нейропротективная активность L-лизина сукцината и «Лизиния» на модели острого нарушения мозгового кровообращения по типу ишемического инсульта [10]. Однако эффективность соединений L-лизина на модели геморрагического инсульта остается не изученной.

Цель исследования – изучение энерготропных свойств соединений L-лизина в условиях моделирования интрацеребрального кровоизлияния.

Материалы и методы. Экспериментальная часть выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Геморрагический инсульт (ГИ) моделировали путем введения во внутреннюю капсулу головного мозга аутокрови, взятой из хвостовой вены животного (20 мкл/100 г). Для проведения всех манипуляций животное наркотизировали тиопенталом натрия (40 мг/кг). После достижения полной анестезии крысу размещали на операционном столе спиной кверху и отбирали 50–100 мкл крови из боковой хвостовой вены. Инсулиновый шприц предварительно промывали раствором гепарина (5 МО/мл) для предупреждения свертывания крови в его просвете. После фиксации крысы в стереотаксическом аппарате на участке свода черепа состригали шерсть и обрабатывали поверхность 96 % этиловым спиртом, затем скальпелем рассекали кожу головы по сагиттальной линии и

с помощью микробура делали небольшое отверстие в надкостнице согласно координатам проекции: Н = 7,0 мм, L = 3,0 мм, А = 1,5 мм от брегмы. Кровь в ткань мозга вводили медленно, в течение 3–4 мин. После окончания инфузии иглу оставляли на месте в течение 5 мин, после чего извлекали, а кожу на голове зашивали узловым швом и обрабатывали края спиртовым раствором бриллиантового зеленого [11].

Животные были разделены на 8 экспериментальных групп по 10 животных. Первая группа – интактные животные, вторая – животные с ГИ, третья – животные с ГИ и введением L-лизина гидрохлорида (50 мг/кг), четвертая – животные с ГИ и введением L-лизина сукцината (50 мг/кг), пятая – животные с ГИ и введением L-лизина эсцината (50 мг/кг), шестая – животные с ГИ и введением «Лизиния» (50 мг/кг), седьмая – животные с ГИ и введением тиотриазолина (50 мг/кг), восьмая – животные с ГИ и введением парацетама (500 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 [12].

По истечении срока наблюдения животных выводили из эксперимента под этаминал-натриевым наркозом путем декапитации. В гомогенате головного мозга, приготовленного по стандартной методике, определяли содержание пирувата, лактата и малата [13]. Содержание адениловых нуклеотидов – аденозинтрифосфата (АТФ), аденозиндифосфата (АДФ), аденозинмонофосфата (АМФ) – проводили хроматографическим методом [14].

Сравнение групп проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA for Windows 6.1» (StatSoft Inc., № АХХ R712D833214SAN5), «Microsoft Excel 2003».

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного экспериментального исследования нами было отмечено снижение количества выживших подопытных животных. Так, в группе животных с моделированием ГИ процент выживших животных составил 30. Процент выживших животных на фоне назначения исследуемых соединений составил от 60 до 90 (табл. 1).

Моделирование ГИ приводило на 4 сутки эксперимента к выраженному

Таблица 1

Выживаемость и показатели неврологического дефицита у животных на 4 сутки геморрагического инсульта в условиях применения соединений L-лизина

Группа животных	Средний бал по шкале С. Р. McGrow	Количество выживших животных, %
Ложнооперированные животные (n = 10)	0,30 ± 0,15	100
Животные с ГИ, контроль (n = 6)	14,83 ± 2,01	30
Животные с ГИ + L-лизина гидрохлорид (n = 6)	13,17 ± 2,18	60
Животные с ГИ + L-лизина сукцинат (n = 7)	10,29 ± 1,71	70
Животные с ГИ + L-лизина эсцинат (n = 8)	7,63 ± 1,35*	80
Животные с ГИ + «Лизиний» (n = 9)	4,33 ± 0,78* ^{§Δ}	90
Животные с ГИ + тиотриазолин (n = 8)	8,75 ± 1,10*	80
Животные с ГИ + парацетам (n = 5)	12,40 ± 2,42	50

Примечание. Здесь и в табл. 2–3: *p < 0,05 по отношению к контролю; ^Δp < 0,05 по отношению к группе с введением тиотриазолина; [§]p < 0,05 по отношению к группе с введением парацетама.

неврологическому дефициту у подопытных животных. Так, в контрольной группе животных средний бал по шкале С.Р. McGrow составил 14,83, что свидетельствует о тяжелой степени неврологического дефицита. Введение соединений L-лизина на фоне моделирования ГИ восстанавливало неврологический статус на 12,7–242 %. Наибольшая активность отмечается в группе животных, получавших «Лизиний» в дозе 50 мг/кг, где средний бал по шкале С.Р. McGrow составил 4,33, что на 240 % ниже относительно группы контроля ($p < 0,05$) (табл. 1).

Одним из наиболее важных звеньев ишемического поражения нейрона является нарушение энергетического метаболизма головного мозга. Это выражается в снижении содержания АТФ и АДФ на фоне увеличения содержания АМФ.

На 4 сутки после моделирования геморрагического инсульта в мозге животных контрольной группы отмечается резкое снижение содержания АТФ и АДФ на 180 % и 74 % соответственно на фоне увеличения АМФ на 49 % относительно ложнооперированных животных (табл. 2).

Применения соединений L-лизина приводило к увеличению содержания АТФ на 18–148 % и АДФ на 15–62 % соответственно при уменьшении содержания АМФ на 6–46 % относительно группы контроля. Наибольшую активность отмечали в экспериментальных

группах с введением L-лизина сукцината и «Лизиния». L-лизина сукцинат за счет наличия в его структурной формуле янтарной кислоты увеличивал концентрацию АТФ и АДФ на 110 % и 48 % соответственно на фоне снижения количества АМФ на 44 % по отношению к группе нелеченых животных. Введения «Лизиния», в химическую формулу которого включен фрагмент тиотриазолина, привело к увеличению АТФ и АДФ на 150 % и на 62 % соответственно на фоне уменьшения содержания АМФ на 46 % относительно контроля (табл. 2).

На фоне нарушения содержания энергетических фосфатов отмечается выраженный дисбаланс субстратов углеводно-энергетического обмена, что проявляется в снижении концентрации малата и пирувата. Так, на 4 сутки моделирования ГИ отмечается уменьшение концентрации малата и пирувата в ткани мозга в 1,8 и 1,1 раза соответственно при значительном увеличении концентрации лактата в 2,4 раза относительно группы ложнооперированных животных (табл. 3).

Введение подопытным животным соединений L-лизина приводило к нормализации концентрации субстратов энергетического обмена. Так, на фоне введения соединений L-лизина на 4 сутки моделирования ГИ концентрация малата увеличивалась на 13–87 %, пирувата на 18–136 %, а концентрация лактата уменьшалась на 9–76 %

Таблица 2

Содержание адениловых нуклеотидов в головном мозге крыс на 4 сутки ГИ в условиях применения соединений L-лизина, $M \pm m$

Группа животных	АТФ, мкмоль/г ткани	АДФ, мкмоль/г ткани	АМФ, мкмоль/г ткани
Ложнооперированные животные (n = 10)	2,95 ± 0,09	0,45 ± 0,02	0,13 ± 0,01
Животные с ГИ, контроль (n = 6)	1,05 ± 0,07	0,26 ± 0,02	0,19 ± 0,01
Животные с ГИ + L-лизина гидрохлорид (n = 6)	1,23 ± 0,10	0,30 ± 0,03	0,18 ± 0,02
Животные с ГИ + L-лизина сукцинат (n = 7)	2,24 ± 0,28*	0,39 ± 0,04*	0,14 ± 0,01*§
Животные с ГИ + L-лизина эсцинат (n = 8)	1,72 ± 0,08*	0,34 ± 0,03	0,16 ± 0,01
Животные с ГИ + «Лизиний» (n = 9)	2,60 ± 0,21*§Δ	0,42 ± 0,03*	0,13 ± 0,01*§Δ
Животные с ГИ + тиотриазолин (n = 8)	1,95 ± 0,06*§	0,39 ± 0,03*	0,15 ± 0,01*
Животные с ГИ + пирацетам (n = 5)	1,49 ± 0,12*	0,36 ± 0,04	0,17 ± 0,01

Показатели углеводно-энергетического обмена в головном мозге животных на 4 сутки геморрагического инсульта в условиях применения соединений L-лизина, $M \pm m$

Группа животных	Пируват, мкмоль/г ткани	Лактат, мкмоль/г ткани	Малат, мкмоль/г ткани
Ложнооперированные животные (n = 10)	0,48 ± 0,02	2,23 ± 0,07	0,30 ± 0,03
Животные с ГИ, контроль (n = 6)	0,23 ± 0,02	7,47 ± 0,18	0,11 ± 0,01
Животные с ГИ + L-лизина гидрохлорид (n = 6)	0,26 ± 0,03	6,83 ± 0,25 [§]	0,13 ± 0,02
Животные с ГИ + L-лизина сукцинат (n = 7)	0,41 ± 0,02* [§]	5,90 ± 0,28* [§]	0,19 ± 0,04
Животные с ГИ + L-лизина эсцинат (n = 8)	0,30 ± 0,02	6,34 ± 0,18* [§]	0,16 ± 0,03
Животные с ГИ + «Лизиний» (n = 9)	0,43 ± 0,02* [§]	4,24 ± 0,12* ^{§Δ}	0,26 ± 0,02* [§]
Животные с ГИ + тиотриазолин (n = 8)	0,36 ± 0,02*	5,64 ± 0,11* [§]	0,20 ± 0,02*
Животные с ГИ + пирацетам (n = 5)	0,30 ± 0,02*	10,04 ± 0,41	0,15 ± 0,02

сительно группы контроля. Наибольшую активность проявили L-лизина сукцинат и «Лизиний». Так, введение L-лизина сукцината приводило к увеличению концентрации малата и пирувата на 73 % и 78 % соответственно, концентрация лактата уменьшалась на 27 % относительно контрольной группы. Экспериментальная терапия «Лизинием» в дозе 50 мг/кг приводила к увеличению концентрации малата и пирувата на 87 % и 136 % соответственно на фоне уменьшения концентрации лактата на 76 % (табл. 3).

Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о высокой нейропротективной и энерготропной активности изучаемых соединений L-лизина. Анализ данных литературы последних лет показал, что в условиях ишемического повреждения головного мозга активность процессов цикла Кребса, контролируемых цитратсинтетазой и α-кетоглутаратдегидроге-

назой, существенно угнетена и реализация компенсаторного сукцинатоксидазного механизма затруднена [15]. Однако продукция АТФ, хотя и на более низком уровне, осуществляется. Это предполагает наличие других компенсаторных механизмов энергопродукции – повышение содержания малата и активности митохондриальной малатдегидрогеназы, что свидетельствует об активации малат-аспартатного механизма [2, 15]. В связи с этим, энерготропная активность соединения L-лизина сукцината в значительной степени снижается в условиях нарушения мозгового кровообращения. Тогда как «Лизиний», в структурной формуле которого присутствует фрагмент структуры тиотриазолина – 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат, оказывает более выраженное энерготропное действие, которое, возможно, реализуется через активацию малат-аспартатного механизма [2, 15–16].

1. Стаднік В. М. Нейровізуалізація в діагностиці церебрального інсульту / В. М. Стаднік, В. В. Куценко // Здоров'я України. – 2010. – № 1, березень. – С. 78.
2. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник [и др]. – Донецк: Издатель Заславский А. Ю., 2009. – 262 с.
3. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М.: Медицина, 2003 – 328 с.
4. Тиотриазолин – фармакологические аспекты и клиническое применение / [И. А. Мазур, Н. А. Волошин, И. С. Чекман и др.]. – Запорожье; Львов, 2005. – 145 с.
5. Метаболитотропные препараты / [И. А. Мазур, И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев та ін.]. – Запорожье, 2007. – 309 с.

6. *Северьянова Л. А.* Нейротропные эффекты L-лизина у крыс / Л. А. Северьянова, И. И. Бобынцев, М. Е. Долгинцев // Сб. тр. 71 науч. конф. КГМУ и сес. ЦЧНЦ РАМН «Университетская наука: взгляд в будущее». Т. 1. – Курск, 2006. – С. 12-13.
7. *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.
8. Пат. № 86668, Україна, МПК C07D 249/08 (2006.01), A61K 31/4196 (2006.01), A61P 9/00, A61P 9/10 (2006.01), A61P 25/28 (2006.01). Лізиній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат / Мазур І. А., Беленічев І. Ф., Колесник Ю. М. [та ін.] ; заявник та патентовласник ТОВ «НВО Фарматрон». – № а200705865; заявл. 25.10.07; опубл. 12.05.09, Бюл. № 9.
9. Некоторые аспекты эндотелиопротективного и метаболитотропного кардиопротектора «Лизиний» / И. Ф. Беленичев, Н. В. Бухтиярова, Ю. М. Колесник, И. А. Мазур // Фармация Украины. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, Харків, 15-17 вер. 2010 р. – Х., 2010. – С. 114–115.
10. *Беленічев І. Ф.* Вплив нового похідного L-лізину на показники окислювального стресу та розвиток неврологічного дефіциту у тварин з гострим порушенням мозкового кровообігу / І. Ф. Беленічев, А. А. Єгоров, І. А. Мазур // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 3 (16). – С. 17–20.
11. *Буреш Я.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 527 с.
12. *McGrow C. P.* Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / C. P. McGrow // Arch. Neurol. – 1977. – V. 34, № 6. – P. 334–336.
13. *Прохорова М. И.* Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л.: Изд-во Ленинградского университета. – 1982. – 272 с.
14. *Захарова Н. В., Рибин В. И.* // Лаб. дело. – 1980. – № 12. – С. 735–738.
15. Malate-Aspartate Shunt in Neuronal Adaptation to Ischemic Conditions: Molecular–Biochemical Mechanisms of Activation and Regulation / I. F. Belenichev, Yu. M. Kolesnik, S. V. Pavlov [et al.] // Neurochemical Journal. – 2012. – V. 6, № 1. – P. 22–28.
16. Биохимические механизмы регуляции продукции энергии в условиях экспериментальной острой церебральной ишемии / Ю. М. Колесник, И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев [и др.] // Доповіди Національної академії наук України. – 2011. – № 9. – С. 165–170.

І. Ф. Беленічев, А. А. Єгоров

Сполуки L-лізину в фармакокорекції порушень енергетичного метаболізму головного мозку при моделюванні геморагічного інсульту

Стаття присвячена вивченню фармакологічних властивостей сполук L-лізину за умов моделювання геморагічного інсульту. За умов гострого порушення мозкового кровообігу за геморагічним типом на 4 добу експерименту спостерігається різке погіршення неврологічного статусу експериментальних тварин. На фоні введення сполук L-лізину в дозі 50 мг/кг відмічається зменшення неврологічного дефіциту, особливо в групах з введенням L-лізину есцинату, L-лізину сукцинату та «Лізинію». На 4 добу після відтворення геморагічного інсульту встановлено значне зменшення вмісту АТФ, АДФ, малату та пірувату на фоні підвищення вмісту лактату та АМФ в гомогенаті головного мозку, що свідчить про порушення енергетичного метаболізму. Експериментальна терапія сполуками L-лізину сприяла відновленню енергопродукції на 4 добу геморагічного інсульту. Найактивнішими енерготропними сполуками виявилися L-лізину сукцинат та «Лізиній», які підвищували вміст АТФ, АДФ, малату та пірувату, та знижували вміст АМФ та лактату. На нашу думку, висока енерготропна активність L-лізину сукцинату реалізується за рахунок активації шунта Робертса. Механізм дії «Лізинію» зумовлений наявністю в структурі цієї сполуки кислотного залишку тіотриазоліну, який має здатність активувати малат-аспартатний механізм продукції енергії. Ґрунтуючись на отриманих результатах, можна стверджувати про наявність у сполук L-лізину нейропротективної та енерготропної активності.

Ключові слова: гостре порушення мозкового кровообігу, L-лізин, нейропротекція, енергетичний метаболізм

І. F. Belenichev, A. A. Egorov

Compounds of L-lysine in pharmacocorrection of disorders of energy metabolism of the brain in the modeling of hemorrhagic stroke

This article describes the results of investigation of influence of L-lysine compounds (hydrochloride, succinate, aescinate and 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate – «Lysinium») under hemorrhagic stroke modeling. Acute disturbance of cerebral circulation (type of hemorrhagic stroke) modeled by injection of autologous blood (20 mkg/ml) in the internal capsule of brain of albino male rats weighing 180–200 g. Compounds of L-lysine were injected intraperitoneally in dosage 50 mg/kg to the animals with hemorrhagic stroke daily from the 1st to 4th day. On the 4th day, injection of compounds of L-lysine to the experimental

animals with intracerebral hemorrhage resulted in decreasing of neurological deficit on 1,66–10,5 units by the C. P. McGrow scale as compared the control group. The greatest activity was shown with L-lysine succinate and L-lysine 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate («Lysinium»). L-lysine administration led to increasing of the content of ATP in brain tissue by 17–148 % and ADP by 15–62 %, and to decreasing of AMP content by 6–46 % as compared control group ($p \geq 0,05$) on the 4th day of the experiment. Injection of compounds of L-lysine to the experimental animals resulted also in the restoration of Krebs cycle functioning and in inhibition of anaerobic glycolysis in the brain (increasing levels of malate by 13–87 %, pyruvate by 18–136 % and decreasing of lactate level by 9–76%). The most active compounds of L-lysine were L-lysiniy succinate and Lysinium with explicit leadership of the latter. Lysinium was superior on all counts ($p \geq 0,05$) as compared to group treated with the Piracetam (dosage – 500 mg/kg) and control group. The mechanism of therapeutic action of L-lysine succinate realized through the compensatory succinateoxidase-related mechanism. However, in conditions of acute stroke the activity of succinateoxidase-related mechanism was complicated, which limited activity of this compound. Lysinium had a stronger energotropic action in comparison with other compounds of this serie, apparently, due to compensatory activation malate - aspartate shuttle mechanism.

Key words: acute violation of cerebral circulation, L-lysine, neuroprotection, energy metabolism

Поступила: 29.11.2013 г.

Контактное лицо: Егоров Артем Анатольевич, кафедра фармакологии и медицинской рецептуры, Запорожский государственный медицинский университет, д. 26, просп. Маяковского, г. Запорожье, 69035. Тел.: +38 0 99 023 24 75. Электронная почта: datas999@gmail.com