

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩЕГО ДИПЕПТИДА НООПЕПТА НА МОДЕЛИ МОЗГОВОГО ИНСУЛЬТА, ВЫЗВАННОГО ДИСТАЛЬНОЙ ПЕРЕВЯЗКОЙ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ

С. А. Гаврилова¹, К. С. Ус², Р. У. Островская², В. Б. Кошелев¹

В опытах на крысах исследовано влияние ноопепта (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицин) на объем ишемического поражения коры большого мозга, вызванного дистальной окклюзией средней мозговой артерии в сочетании с перевязкой ипсилатеральной общей сонной артерии. Препарат вводили внутривенно (0,5 мг/кг) через 15 мин, 2, 24 и 48 ч после операции. Через 72 ч животных декапитировали, головной мозг крыс замораживали. Оценка объема поражения проводили планиметрически в срезах мозга, окрашенных трифенилтетразолий хлоридом. Подобраны условия коагуляции дистального сегмента средней мозговой артерии, при которых развивается очаг некроза, локализованный в пределах фронтопариетальной и дорсолатеральной зон коры, не затрагивающий подкорковые структуры. Объем поражения в группе контрольных животных, получавших физиологический раствор, составил 18,6% от объема ипсилатерального полушария. В группе животных, получавших ноопепт, объем поражения составил 12,2%, то есть был меньше на 34,5% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Полученный результат свидетельствует об эффективности ноопепта в эксперименте, моделирующем массивный кортикальный ишемический инсульт.

Ключевые слова: пролинсодержащий дипептид, ноопепт, инсульт, окклюзия средней мозговой артерии

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение частоты возникновения инсультов и других заболеваний, связанных с ишемией и гипоксией мозга, делает поиск новых лекарственных средств актуальным [8]. Одним из перспективных направлений поиска веществ с нейропротекторной активностью является изучение олигопептидных соединений, характеризующихся высокой биологической доступностью для мозга [2]. На основании гипотезы о пептидергическом механизме действия пирацетама в ГУ НИИ фармакологии РАМН создан ряд N-ацильных производных пролина [3, 15, 11]. Для дальнейшей работы на основании выраженного антиамнестического эффекта и высокой биодоступности для мозга был выбран ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина, ГВС-111). В ранее проведенных экспериментах *in vivo* и *in vitro* получены данные о нейропротекторной активности ноопепта [7]. Так, на модели ишемического инсульта, обусловленного фотоиндуцированным тромбозом префронтальной коры [13], препарат в дозе 0,5 мг/кг в условиях послеоперационного введения снижал объем некротической зоны более чем вдвое. Поскольку методика фотоиндуцированного тромбоза моделирует относительно малый очаг в поверхностных отделах коры, представлялось целесообразным изучить эффект препарата на модели более обширного поражения мозга. Известно, что у человека большинство инсультов (до 75%) происходит в бассейне средней мозговой арте-

рии. В связи с этим представляло интерес изучить эффект ноопепта на модели окклюзии среднемозговой артерии (СМА). Известно несколько модификаций этой операции. Проксимальная перевязка СМА вызывает обширное поражение не только коры, но и подкорковых структур [8]. Поскольку подход осуществляется через основание черепа, операция травматична и сложна технически. Дистальная перевязка СМА, более легкая в техническом отношении и ведущая к относительно ограниченному поражению мозга, также осуществляется в нескольких модификациях. Это может быть как изолированная коагуляция СМА [8], так и сочетающаяся либо с постоянной ипсилатеральной и временной контралатеральной окклюзией общей сонной артерии, либо с постоянной окклюзией ипсилатеральной сонной артерии [8]. Задачей настоящего исследования было изучение нейропротекторного действия ноопепта на модели ишемического инсульта, вызванного дистальной окклюзией средней мозговой артерии и ипсилатеральной общей сонной артерии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах самцах массой 350 – 450 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. В серии предварительных экспериментов, когда проводили только коагуляцию СМА, наблюдали большую вариабельность объема поражения коры в контрольной группе, что связано, по-видимому, с индивидуальными особенностями ветвления средней мозговой артерии у крыс. Поэтому в последующем была использована дистальная окклюзия левой СМА в сочетании с односторонней перевязкой левой сонной артерии [10]. Крыс наркотизировали хлоралгидратом, 400 мг/кг, внутривенно коагуляцию сосуда и перевязку артерии проводили с левой стороны. После завершения операции животных

¹ Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 119192, Ломоносовский просп., 31, корп.5.

² ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

случайным образом делили на 2 группы. Крысам первой группы ($n=9$) вводили ноопепт в инъекционной лекарственной форме, разрабатываемой в опытно-технологическом отделе Института фармакологии РАМН. Препарат вводили внутривентриально через 15 мин, затем через 2, 24 и 48 ч после операции. Животные контрольной группы ($n=8$) в те же сроки получали физиологический раствор. Через 72 ч после окклюзии СМА животных под наркозом (хлоралгидрат 800 мг/кг, внутривентриально) декапитировали. Головной мозг извлекали и замораживали при температуре -20°C .

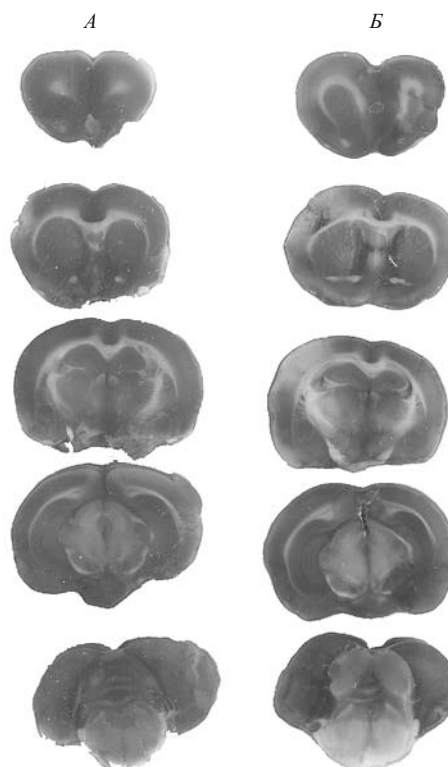
Затем проводили морфологическую оценку повреждения головного мозга крыс. Фронтальные срезы мозга толщиной 2,5 мм окрашивали в 0,5% растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при температуре 37°C в течение 30 мин и фиксировали в 10% растворе формалина. Окрашенные ТТХ срезы головного мозга сканировали. С помощью планиметрической программы Auc1 определяли площади коры левого полушария и зоны поражения (неокрашенные участки) с двух сторон срезов; рассчитывали отношение объема поражения к общему объему коры полушария в процентах. Для сравнения выраженности изменений в различных срезах использовали условную шкалу, в которой поражение 75% полушария оценивали в 2,5 балла, 60% — 2; 45% — 1,5; 20% — 1; 5% — 0,5; 0% — 0 баллов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью непараметрического критерия (U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). Результаты представлены в виде $M \pm S. E. M.$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с литературными данными, представленными в частности, в обзоре [8], в условиях применяемой модели дистальной окклюзии СМА отмечено поражение коры большого мозга, локализующееся в пределах фронтопаритетальной и дорсолатеральной зон без сопутствующего вовлечения подкорковых структур. Если при коагуляции только СМА объем поражения варьировал в разных экспериментах от 6 до 20%, при использовании дополнительной перевязки ипсилатеральной сонной артерии объем повреждения стабилизировался. У контрольных животных, которым вводили физиологический раствор, общий объем поражения составлял $18,6 \pm 2,6\%$. Полученная в настоящих экспериментах степень поражения мозга в группе контрольных животных близка по объему таковой при аналогичном вмешательстве в других исследованиях [12]. Максимальное ишемическое повреждение имеет место на уровне 2-го и 3-го срезов. Терапия ноопептом приводила к достоверному уменьшению объема повреждения на уровне трех первых срезов при отсутствии достоверных изменений на уровне 4-го и 5-го срезов (таблица).

В группе крыс, получавших ноопепт, общая площадь поражения составляла $12,2 \pm 2,6\%$, что на 34,5% ($p < 0,05$) меньше объема поражения в контрольной группе (рисунок). Эффект по выраженности сравним с при-



Ноопепт, вводимый после окклюзии средне-мозговой артерии и перевязки ипсилатеральной сонной, уменьшает объем ишемического повреждения коры головного мозга крыс.

А — срезы головного мозга крысы из контрольной группы, которой после операции вводили физиологический раствор.

Б — срезы головного мозга крысы из опытной группы, которой вводили ноопепт в дозе 0,5 мг/кг (в/бр), через 15 мин, 2, 24 и 48 ч после ишемизирующего воздействия.

меняемой в клинических условиях нейропротекторной смесью, состоящей из нимодипина, дексаметазона и маннитола, вызывающей уменьшение объема поражения на 35% [16], а также с влиянием дексанабинола - синтетического каннабинола, неконкурентного блокатора NMDA-рецепторов, уменьшающего некроз на 28% [12]. При фотоиндуцированном тромбозе, по полученным ранее данным, ноопепт уменьшал более чем вдвое объем ишемического повреждения [13]. Меньший в процентном значении защитный эффект, полученный в данной работе, по-видимому, обусловлен большим объемом поражения при окклюзии СМА.

Известно, что основными факторами, определяющими объем поражения мозга во время ишемии, являются: избыток возбуждающих аминокислот в межклеточном пространстве, повышение концентрации внутриклеточ-

Влияние ноопепта на выраженность ишемического поражения коры большого мозга (оценка срезов по баллам: поражение 75% от всей поверхности ипсилатерального полушария 2,5; 60% — 2; 45% — 1,5; 20% — 1; 5% — 0,5; 0% — 0); $M \pm SEM$

Группа животных	Порядковый номер среза				
	1	2	3	4	5
Физр-р ($n=8$)	$0,5 \pm 0,11$	$1,44 \pm 0,2$	$1,38 \pm 0,22$	$0,69 \pm 0,15$	$0,19 \pm 0,1$
Ноопепт, 0,5 мг/кг ($n=9$)	$0,06 \pm 0,01^*$	$1,06 \pm 0,1^*$	$0,8 \pm 0,2^*$	$0,63 \pm 0,12$	$0,19 \pm 0,1$

* $p < 0,05$

ного кальция, генерация активных форм кислорода и несостоятельность систем антиоксидантной защиты (“оксидантный стресс”). Биосинтез провоспалительных цитокинов, интерлейкинов 1 и 6, фактора некроза опухоли, активация индуцибельной NO-синтазы усугубляют ситуацию. В отличие от большинства известных нейропротекторов, действующих изолированно на один из компонентов метаболического каскада, ноопепт обладает многокомпонентным нейропротекторным эффектом. Он предотвращает вызванное стрессом накопление продуктов перекисного окисления липидов, снижая содержание диеновых конъюгатов и шиффовых оснований, повышает активность эндогенных антиоксидантных систем - супероксиддисмутазы, каталазы и церулоплазмينا, обладает антитромботическим эффектом [5, 6]. Нейропротекторное действие ноопепта продемонстрировано на культуре нейронов коры большого мозга человеческих плодов с диагностированным синдромом Дауна (Университет Farmington, Connecticut, США). Этим нейронам свойственна ускоренная гибель вследствие повышенной выработки свободных радикалов. Ноопепт (10^{-6} М) уменьшал образование свободных радикалов, повышал выживаемость нейронов, ослабляя выраженность нарушений целостности мембран, фрагментации ДНК [14] в нейрональных культурах из мозга абортированных плодов. Как показано в опытах на изолированных нейронах виноградной улитки, ноопепт вызывает блокаду потенциалзависимых кальциевых и в еще большей степени кальцийзависимых калиевых каналов [9]. В экспериментах на культуре зернистых нейронов мозжечка выявлена способность препарата ослаблять нейротоксический эффект глутамата [1]. На моделях острого неиммунного и хронического иммунного воспаления выявлен выраженный противовоспалительный эффект ноопепта [4].

В настоящее время в качестве ноотропного препарата (лекарственная форма для применения внутрь таблетки по 5 мг) ноопепт успешно прошел IIa фазу клинических испытаний. Полученные в настоящей работе данные, свидетельствующие об эффективности ноопепта на модели массивной кортикальной ишемии, подтверждают перспективность разработки данного препарата в качестве средства лечения ишемических инсультов.

ВЫВОДЫ

1. При дистальной окклюзии средней мозговой артерии в сочетании с перевязкой ипсилатеральной общей сонной артерии развивается очаг некроза, который составляет 18,6% по отношению к общему объему ипсилатерального полушария.

2. Пролинсодержащий дипептид ноопепт, вводимый в течение трех дней после ишемического воздействия в дозе 0,5 мг/кг, снижает объем зоны поражения, что свидетельствует о нейропротекторном эффекте препарата.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 03-04-49049а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Андреева, Е. В. Стемальшук, Н. К. Исаев и др., *Бюл. экпер. биол.*, **130**(10) 418 – 421 (2000).
2. И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева, Л. П. Ляпина и др., *Ж. высш. нерв. деят.*, **47**(2), 420 – 430 (1997).
3. Т. А. Гудашева, С. С. Трофимов, Ф. В. Иенкина и др., *Хим.-фарм. ж.*, **11**, 1322 – 1319 (1985).
4. Л. П. Коваленко, М. Г. Мирамедова, С. В. Алексеева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(2), 53 – 55, (2002).
5. А. М. Менджерицкий, А. В. Лысенко, С. В. Демьяненко и др., *Нейрохимия*, **20**(4), С. 281 – 286(2003).
6. Р. У. Островская, Л. А. Ляпина, В. Е. Пасторова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(2), 34 – 37 (2002).
7. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(5), 66 – 72 (2002).
8. В. П. Чехонин, С. В. Лебедев, С. В. Петров и др., *Вестн. АМН.*, **3**, 47 – 54 (2004).
9. Ju. Bukanova, E. Solnzeva, and V. G. Skrebitsky, *Internat. J. Neuropsychopharm.*, **5**, 229 – 237 (2002).
10. S. T. Chen, C. Y. Hsu, E. L. Hogan, et al., *Stroke*, **17**, 738 – 743 (1986).
11. Т. А. Гудашева, Т. А. Воронина, Р. У. Островская, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **31**, 151 – 157 (1996).
12. R. R. Leker, E. Shohami, O. Abramsky, and H. Ovardia, *J. Neurological Scienc.*, **162**, 114 – 119 (1999).
13. R. U. Ostrovskaya, G. A. Romanova, I. V. Barskov, et al., *Behav Pharmacol.*, **10**, 549 – 553 (1999).
14. A. Pealsman, H. Carlos, R. U. Ostrovskaya, et al., *Int. J. Devl Neuroscience*, **803**, 1 – 8 (2003).
15. S. B. Seredenin, T. A. Voronina, T. A. Gudasheva, et al., Патент США 5,439,930 (1995)
16. S. Zausinger, T. Westmaier, N. Plesnila, et al., *Stroke.*, **34**(6), 1526 – 32 (2003).

Поступила 05.12.05

NEUROPROTECTIVE ACTIVITY OF THE PROLINE-CONTAINING DIPEPTIDE NOOPEPT ON THE MODEL OF BRAIN ISCHEMIA INDUCED BY THE MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION

S. A. Gavrilova¹, K. S. Us², R. U. Ostrovskaya², and V. B. Koshelev¹

¹ Department of Fundamental Medicine, Moscow State University, Lomonosovskii pr. 31/5, Moscow, 119192 Russia;

² Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

The influence of noopept (N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, GVS-111) on the extent of ischemic cortical stroke was investigated in experiments on white mongrel male rats with ischemia induced by a combination of the middle cerebral artery occlusion with ipsilateral common carotid artery ligation. Animals were treated with noopept (0.5 mg/kg, i.p.) according to the following schedule: 15 min and 2, 24, and 48 h after the occlusion. Test rats were decapitated 72 h after occlusion, brains were extracted and frozen, and thin brain slices were stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. The slices were scanned and processed using Auc1 computer program, which estimates the percentage of damaged area relative to that of the whole ipsilateral hemisphere. The conditions of coagulation the distal segment of middle cerebral artery were selected, which caused necrosis localized in the fronto-parietal and dorso-lateral regions of the brain cortex without any damage of subcortical structures. The extent of the brain damage in control group (treated by saline) was 18,6%, while that in the group treated with noopept was 12.2%, thus demonstrating a decrease in the infarction area by 34.5% ($p < 0.05$). The data on noopept efficacy on the model of the extensive ischemic injury of brain cortex show that this drug has good prospects for use in the neuroprotective treatment of stroke.