

**ЭФФЕКТ ВНУТРИГАСТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ
КРЕАТИНИЛГЛИЦИН ЭТИЛОВОГО ЭФИРА ФУМАРАТА
ПРИ ОККЛЮЗИОННОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У КРЫС**

© Н. В. Кратирова,^{1,2} О. С. Веселкина,² М. Э. Колпакова,¹ С. Г. Чефу,¹
Д. Э. Коржевский,³ А. С. Дайнеко,¹ М. С. Просвирнина,¹
А. В. Пискун,¹ Т. Д. Власов¹

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8,
e-mail: patho@yandex.ru;

² ЗАО «ВЕРТЕКС», Россия, 199106, Санкт-Петербург, В. О., 24 линия, 27А;

³ Институт экспериментальной медицины РАМН,
Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

Целью исследования являлась оценка нейропротективного действия креатинилглицин этилового эфира фумарата (препарата креамид). Методика включала внутригастральное введение креамида в дозе 30 и 50 мг/кг 2 раза в сутки в течение 10 дней. Модель фокальной 30-минутной ишемии головного мозга воспроизводилась эндovasкулярно с последующим периодом реперфузии 48 ч. Определяли стабильность креамида в желудочном соке, процентное отношение площади некроза, а также производили гистологическое исследование и выявляли неврологический дефицит у крыс. В результате были получены данные о достоверном нейропротективном эффекте креамида в дозе 50 мг/кг 2 раза в сутки, который уменьшал ишемическое и реперфузионное повреждение головного мозга.

Ключевые слова: креатинилглицин этиловый эфир фумарат, креамид, ишемия мозга, нейропротекция.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 89. № 10. С. 00—00. 2012

N. V. Kratirova,^{1, 2} O. S. Veselkina,² M. E. Kolpakova,¹ S. G. Chefu,¹ D. E. Korzhevskii,³ A. S. Daineko,¹ M. S. Prosvirinina,¹ A. V. Piskun,¹ T. D. Vlasov¹. EFFECT OF INTRAGASTRIC CREATINE GLYCINE ETHYLIC ETHER FUMARATE ADMINISTRATION IN A RAT MODEL OF OCCLUSIVE ISCHEMIA. ¹ Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, 197022, Lev Tolstoy Str., 6/8, Russia, e-mail: patho@yandex.ru; ² «VERTEX», St. Petersburg, 199106, 24th line VO, 27A, Russia; ³ Institution of Experimental Medicine of the North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376, Fcfd. Pavlov Str., 12, Russia.

The aim of the study was to investigate neuroprotective effect of creatine glycine ethylic ether fumarate (creamide). The methods involved intragastric administration of creamide in doses of 30 and 50 mg/kg twice a day for 10 days. Focal 30 minutes Cerebral Ischemia Model by Endovascular Suture Occlusion of the Middle Cerebral Artery in a rat with subsequent reperfusion period for 48 hours was produced. Assessment of creamide stability in gastric juice was performed. Ischemic lesion volume accompanying focal ischemia was visualized and determined. Similar infarction patterns had been found with histological methods. Garcia scale was used for clinical study of neurological deficit in rats. Our data suggest a significant neuroprotective effect of creamide in dosage

50 mg/kg administered twice a day which decreased brain lesion volume produced by ischemic and reperfusion injury.

Key words: creatine glycine ethylic ether fumarate, creatine, creatine, creatine, brain ischemia, neuroprotection.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 98. N 10. P. 00—00. 2012

Одним из направлений в разработке фармакологических препаратов, оказывающих защитное действие при ишемии головного мозга, является поиск соединений, увеличивающих энергетический потенциал клетки с помощью субстратов энергетического обмена, таких как производные креатина [4]. Экспериментально доказано, что креатин оказывает нейропротективное действие при гипоксическом повреждении тканей головного мозга мышшей [8, 15], обладает способностью уменьшать выраженность оксидативного стресса, вызванного ишемией [10]. Получены данные, показывающие, что при ишемии головного мозга крысы нейропротективное действие оказывают амиды креатина и природных β -аминокислот [1]. Целью настоящего исследования явилось изучение эффекта креатинилглицин этилового эфира фумарата (препарат Креамид) на выраженность ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85-23, США) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей редакцией Р. У. Хабриева. Изд. второе, 2005. Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар массой 240 ± 20 г (РАН, питомник лабораторных животных Института физиологии им. И. П. Павлова, Колтуши). Животных содержали на стандартном рационе для лабораторных крыс К-120 (Информ-корм, Россия) и воды *ad libitum*.

Исследовался нейропротективный эффект креатинилглицина этилового эфира фумарата (препарат Креамид) (рис. 1). Препарат вводился внутривентрикулярно в дозах 30 и 50 мг/кг в объеме 1 мл 2 раза в день в течение 10 дней. Животные контрольной группы получали воду внутривентрикулярно дважды в день в течение 10 суток. Через 1 ч после последнего введения воспроизводилась эндovasкулярная окклюзия средней мозговой артерии по методике [9]. Длительность ишемии составила 30 мин, длительность последующей реперфузии — 48 ч [9]. Все операционные вмешательства производились под анестезией тиопенталом натрия (60 мг/кг, внутривентрикулярно). Оценку неврологического дефицита животных проводили по шкале J. Garcia [6]. Площадь зоны повреждения выявлялась с помощью окраски срезов мозга 0.1%-ным раствором трифенилтетразолия хлорида (ТТС) (MP Biomed., США) при температуре 37 °C в течение 15 мин. За счет значительного снижения активности НАД-зависимых дыхательных ферментов митохондрий в зоне повреждения (некроза) последняя остается бесцветной, в то время как неизменная ткань приобретает красный цвет за счет преобразования бесцветного ТТС в окрашенный продукт — формазан. Затем с помощью фотоаппарата, подсоединенного к микроскопу, получали цифровые фотографии передней и задней поверхности срезов, которые обрабатывались в программе ImageJ, разработанной в National Institutes of Health. Далее вычисляли средний показатель повреждения каждого среза, средний показатель объема повреждения каждого полушария в процентах.

Дополнительная гистологическая оценка повреждения головного мозга была проведена через 48 ч после ишемии на отдельной серии животных ($n = 14$). Материал фиксировали в

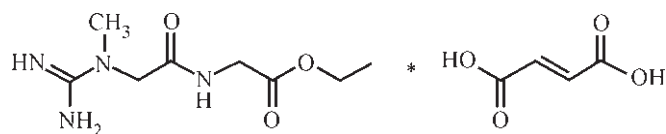


Рис. 1. Структурная формула креатинилглицина этилового эфира фумарата.

цинк-этанол-формальдегиде [2, 3] в течение 24 ч. Серийные срезы толщиной 5 мкм готовили на ротационном микротоме Leica RM 2225 RT (Leica, Германия) и наклеивали на предметные стекла, покрытые полилизинем (Menzel, Германия). Изготовленные срезы окрашивали толуидиновым синим (БиоВитрум, Россия) по Нисслию и проводили иммуноцитохимические реакции на ядерный антиген нервных клеток NeuN. Для иммуноцитохимических исследований использовали реагенты фирм Chemicon-Millipore (США), Dako (Дания), Biogenex (США). Полученные препараты анализировали при помощи микроскопа Leica DM750 и фотографировали встроенной цифровой камерой ICC50 (Leica, Германия). Измерения и подсчеты осуществляли при помощи программного обеспечения Leica LAS EZ (Leica, Германия).

Оценка стабильности креамида в искусственном желудочном соке [0.2 г натрия хлорида (Sigma, кат. № 028K0009), 0.32 г пепсина (from porcine gastric mucosa, 0.7 FIP-U/mg, for biochemistry, EC 3.4.23.1, Merck кат. № K38233185 809), 0.7 мл соляной кислоты концентрированной в 100 мл воды pH 1.4 ± 0.05]. 0.1%-ный (0.1 мл) раствор креамида в искусственном желудочном соке выдерживали при температуре 37 ± 0.5 °С. Содержание креамида в растворе определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Zorbax Eclipse C₁₈, 3.5 мкм, 3 · 100 мм. Подвижная фаза — смесь буферного раствора, содержащего 0.012 М натрия октансульфоната и 0.03 М натрия дигидрофосфата, с ацетонитрилом (90:10). Детектирование проводили при длине волны 210 нм.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программного пакета SPSS-13. Статистическая значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни для независимых выборок. Все показатели были представлены в виде «среднее ± стандартная ошибка среднего».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния внутригастрального введения препарата на коэффициент повреждения показало, что креамид в дозах 30 и 50 мг/кг достоверно уменьшал ишемическое и реперфузионное повреждения головного мозга (рис. 2). Наблюдается отчетливая тенденция увеличения нейропротекции в зависимости от дозы (30 и 50 мг/кг), хотя разница между ними не достигала степени достоверности ($p > 0.05$).

Гистологическое исследование препаратов мозга в контрольной группе, т. е. у крыс с ишемией головного мозга с предварительным внутригастральным введением воды (контроль), показало выраженное повреждение головного мозга с незначительно сохраненными нейронами. Внутригастральное введение препарата креамида в дозе 50 мг/кг до моделирования ишемического повреждения приводило к увеличению сохранности (до 50 %) нейронов изучаемой области (рис. 3). Таким образом, данные гистологического исследования подтвердили снижение выраженности морфологического повреждения головного мозга. Доза 30 мг/кг также оказывала защитный эффект несколько менее выраженно, чем 50 мг/кг.

Результаты оценки неврологического состояния животных выявили следующее: в контрольной группе после 30-минутной окклюзии средней мозговой артерии с последующей 48-часовой реперфузией показатель неврологического статуса по шкале Garcia у животных был оценен в 13.5 ± 2.3 балла. В группах с введением креамида неврологические показатели приближались к таковым у интактных животных (18 баллов): так, при дозе 30 мг/кг неврологические показатели были оценены в 17.1 ± 0.9 балла, а при дозе 50 мг/кг — в 17.6 ± 0.7 балла. Статистическая значимость по отношению к контролю $p \leq 0.001$. Различий между действием препарата в опытных группах не выявлено. Таким образом, анализ неврологического состояния крыс подтверждает достоверный нейропротективный эффект креамида при внутригастральном введении в дозах 30 и 50 мг/кг в течение 10 суток до воспроизведения 30-минутной ишемии головного мозга с 48-часовой реперфузией.

Оценка стабильности креамида в присутствии пепсина служит важным фактором понимания стабильности пероральной формы препарата для объяснения возможного цитопротективного действия креамида (см. таблицу).

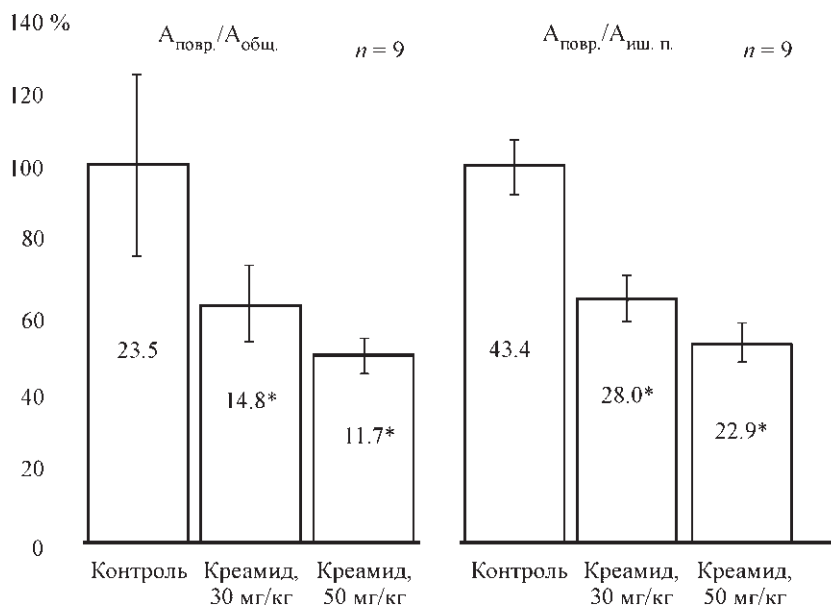


Рис. 2. Повреждение головного мозга крыс при 30-минутной ишемии и 48-часовой реперфузии на фоне курсового введения креамида в дозе 30 и 50 мг/кг.

$A_{\text{повр.}}/A_{\text{общ.}}$ — процентное отношение площади некроза к площади фронтального среза мозга; $A_{\text{повр.}}/A_{\text{иш. п.}}$ — процентное отношение площади некроза к площади ишемизированного полушария. * Статистическая значимость $p < 0.02$.

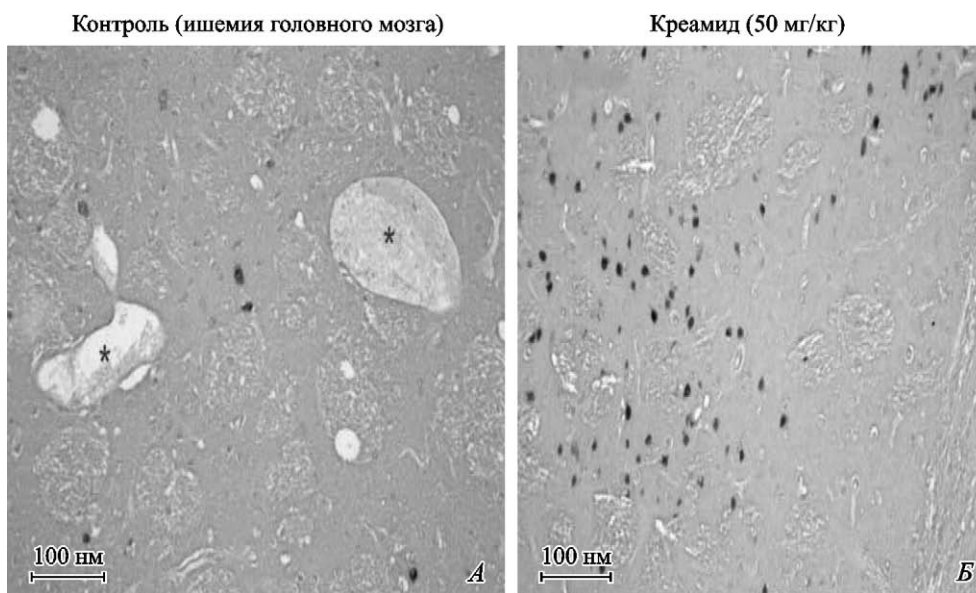


Рис. 3. Гистологическое исследование нервных клеток с окраской на специфический ядерный антиген (NeuN+).

А — со стороны повреждения (ишемии): в стриатуме кровеносные сосуды расширены, имеется периваскулярный отек. Количество NeuN+ нейронов в стриатуме уменьшается в 5—10 раз; *Б* — со стороны повреждения (ишемии): сосуды расширены умеренно, мозаичный периваскулярный отек. Очаговая утрата примерно 50 % NeuN+ клеток. Очаги локализируются преимущественно субкортикально. Звездочкой помечены расширенные сосуды.

Стабильность креамида в искусственном желудочном соке

Время гидролиза, ч	Концентрация креамида, мг/мл	Концентрация креамида, %
0	0.100	100
3	0.094	94
10	0.087	87

Таким образом, креамид был достаточно стабилен при взаимодействии с кислой средой желудочного сока, что предполагает сохранность его структуры в условиях поступления через желудочно-кишечный тракт (см. таблицу).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что истощение энергетических ресурсов клетки в результате митохондриальной дисфункции при гипоксии — одна из основных причин ее ишемической гибели [17]. Возобновление поступления кислорода и увеличение образования свободнорадикальных форм резко нарушает функциональную активность митохондрий. Источниками активных форм кислорода при ишемии служат гипоксантин, образующийся при деградации АТФ в условиях падения рН и являющийся субстратом для ксантинооксидазы, а также восстановленные ионы Fe^{2+} и высвобожденный из митохондрий цитохром С [14]. Накопление свободных радикалов, частично связанное с высвобождением связанного с трансферрином железа — инициатора окислительных процессов, приводит к повреждению митохондрий с угнетением цитохромоксидазы [11]. Это ведет к прогрессирующему снижению концентрации макроэргов в головном мозге и дальнейшему повреждению ткани головного мозга, в том числе с участием механизмов эксайтотоксичности [5]. Так как нервная ткань головного мозга не имеет достаточных антиоксидантных резервов (каталаза, глутатионпероксидаза), возникает выраженное повреждение клеточных мембран в процессе перекисного окисления липидов, что является неспецифическим индуктором эксайтотоксических процессов [7].

Одним из направлений нейропротекции при ишемическом повреждении головного мозга рассматривается применение креатина. Предполагается, что это приводит к поддержанию уровня АТФ при дефиците кислорода, и в свою очередь вторично сопровождается уменьшением количества экстраинаптического глутамата [16]. Превентивное введение креатина уменьшает ишемическое повреждение головного мозга на различных моделях ишемии и гипоксии у животных. Так, его поступление в головной мозг незадолго до ишемии стимулирует образование АТФ, что пролонгирует период резистентности к острому гипоксическому повреждению [8, 12]. Парентеральное введение производного креатина — магниевого комплекса фосфокреатина (PCr-Mg-CPLX) за 30 мин до ишемии мозга — оказывало выраженный нейропротективный эффект на модели окклюзии средней мозговой артерии у мышей [13]. По нашим предыдущим данным экспериментально показано, что различные амиды креатина оказывают выраженное нейропротективное действие при их внутривенном болюсном введении [1] на модели окклюзии среднемозговой артерии у крыс.

В настоящем исследовании мы использовали внутригастральное введение фумарата этилового эфира креатинилглицина (препарат креамид). Данные гистологического исследования и оценки показателей повреждения и неврологического дефицита у животных при моделировании окклюзионной ишемии подтвердили снижение выраженности ишемического повреждения головного мозга на фоне предварительного десятидневного курса креамида. Мы предполагаем, что поскольку креамид стабилен в среде желудочно-кишечного тракта, его структура сохраняется после поступления в кровь, что может быть основой его нейропротективного эффекта при пероральном введении.

Полученные данные открывают перспективы дальнейшего изучения производных креатина и разработки препаратов, эффективно уменьшающих ишемическое и реперфузионное повреждение головного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Власов Т. Д., Чефу С. Г., Байса А. Е., Леко М. В., Буров С. В., Веселкина О. С. Амиды креатина: перспективы нейропротекции. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 97 (7): 708—716. 2011.
- [2] Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейростологических исследованиях. Морфология. 1: 85—87. 2006.
- [3] Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Байса А. Е., Власов Т. Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии. Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 147 (2): 255—256. 2009.
- [4] Отеллин В. А., Коржевский Д. Э., Косткин В. Б., Балестрино М., Ленцман М. В., Поленов С. А. Нейропротекторный эффект креатина при ишемии головного мозга. Докл. АН. 390 (3): 406—408. 2003.
- [5] Beal M. F., Hyman B., Koroschetz W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases. *Trend. Neurosci.* 16(4): 125—131. 1993.
- [6] Garcia J., Wagner S., Kai-Feng Liu, Xiao-Jiang Hu. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 26: 627—635. 1995.
- [7] Gellert L., Fuzis J., Gublyus A., Sarkuzi K., Marosi M., Kis Z., Farkas T., Szatmari I., Fülöp F., Vecsei L., Toldi J. Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 667: 182—187. 2011.
- [8] Ireland Z., Castillo-Melendez M., Dickinson H., Snow R., Walker D. W. A maternal diet supplemented with creatine from mid-pregnancy protects the newborn spiny mouse brain from birth hypoxia. *Neuroscience.* 194: 372—379. 2011.
- [9] Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke.* 8: 1—8. 1986.
- [10] Lawler J. M., Barners W. S., Wu G., Song W., Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 47—52. 2002.
- [11] Niizuma K., Endo H., Chan P. H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J. Neurochem.* 109 (1): 133—138. 2009.
- [12] Ohtsuki S., Tachikawa M., Takanaga T., Shimizu H. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine in the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 1327—1335. 2002.
- [13] Perasso L., Adriano E., Ruggeri P., Burov S. V., Gandolfo C., Balestrino M. In vivo neuroprotection by creatine-derived compound: phosphocreatinibe — Mg-complex acetate. *Brain Res.* 1285: 158—163. 2009.
- [14] Pereverzev M. O., Vygodina T. V., Konstantinov A. A., Skulachev V. P. Cytochrome C, an ideal antioxidant. *Biochem. Soc. Trans.* 31(6): 1312—1315. 2003.
- [15] Prass K., Royl G., Lindauer U., Freyer D., Megow D., Dirnagl U., Stuckler-Ipsiroglu G., Wallimann T., Priller J. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27(3): 452—459. 2006.
- [16] Willmann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K., Eppenberger H. M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the «phosphocreatine circuit» for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 281: 21—40. 1992.
- [17] Yager J. Y., Brucklacher R. M., Vannucci R. C. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immaturerats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 262: H672—H677. 1992.

Поступила 6 VII 2012
После доработки 23 VII 2012