

**ЦИТОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА КРЕАМИД
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС**

© О. С. Веселкина,¹ Н. В. Кратирова,^{1,2} М. Э. Колпакова,²
С. Г. Чефу,² Т. Д. Власов²

¹ ЗАО «ВЕРТЕКС», Россия, 199106, Санкт-Петербург, В. О., 24 линия, 27А;

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8,
e-mail: patho@yandex.ru

Одним из важных направлений в нейропротекции может быть влияние на энергетический потенциал клетки с помощью креатина или его производных. Было исследовано действие препарата креамид (креатинилглицин этиловый эфир фумарат) при экспериментальной ишемии/реперфузии головного мозга крыс. Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар 14—20-недельного возраста, массой 240—300 г под анестезией хлоралгидратом в дозе 430 мг/кг. Креамид вводили внутривенно болюсно в дозах 50, 70, 140 и 280 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовался фосфокреатин в дозе 255 мг/кг. Креамид и препарат сравнения вводились внутривенно за 30 мин до окклюзии в объеме 1 мл в течение 5 мин. Модель фокальной 30-минутной ишемии головного мозга воспроизводилась эндоваскулярно с последующим периодом реперфузии 48 ч. Влияние креамида на степень повреждения головного мозга крысы носило дозозависимый характер; нейропротекторная эффективность креамида в дозах 140 и 280 мг/кг была выше, чем фосфокреатина. Полученные данные открывают перспективы дальнейшего изучения креамида и разработки других креатинсодержащих препаратов, эффективно уменьшающих ишемическое повреждение головного мозга.

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

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 98. № 9. С. 00—00. 2012

O. S. Veselkina,¹ N. V. Kratirova,^{1,2} M. E. Kolpakova,² S. G. Chefu,² T. D. Vlasov.² CYTOPROTECTIVE EFFECT OF CREAMIDE DRUG IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF THE BRAIN ISCHEMIA/REPERFUSION IN RATS. ¹ «VERTEX», St. Petersburg, 199106, 24th line V. O., 27A. Russia; ² St. Petersburg State I. P. Pavlov Medical University, St. Petersburg, 197022, Lev Tolstoy Str., 6/8. Russia. E-mail: patho@yandex.ru.

The influence of creatine or its derivatives on the cell energy potential may be one of the possible approaches to induce neuroprotection. Effect of creamide (creatinylglycine ethylic ether fumarate) on the brain injury was studied in the experimental model of the brain ischemia/reperfusion in rats. The experiments were carried out in 14—20 weeks old male Wistar rats weighing 240—300 g, anesthetized by chloral hydrate (430 mg/kg). Creamide was administered intravenously at the doses of 50, 70, 140, and 280 mg/kg. For comparison phosphocreatine was used at the dose of 255 mg/kg. Creamide and phosphocreatine were administered intravenously (in volume of 1 ml within 5 min) 30 min before cerebral middle artery occlusion. Focal cerebral ischemia for 30 min was produced by endovascular suture occlusion with the subsequent 48 h reperfusion period. Creamide administration resulted in dose-dependent decrease of brain ischemic injury. Creamide administered at the doses of 140 and 280 mg/kg was more effective as compared with phosphocreatine

(255 mg/kg). The data obtained open new perspectives for further research and development of new creatine-derived drugs with neuroprotective action.

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

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 98. N 9. P. 00—00. 2012

В последние годы особую актуальность приобретает поиск и разработка фармакологических препаратов, которые оказывают протекторное действие при ишемии головного мозга. Ишемическое поражение головного мозга является одним из наиболее частых и тяжелых заболеваний сердечно-сосудистой системы, приводящих к высокому риску инвалидизации и смертности. Многофакторность ишемического каскада обуславливает наличие нескольких биологических мишеней, воздействие на которые может обеспечить нейропротекторный эффект.

Одним из важных направлений в нейропротекции может быть воздействие на энергетический потенциал клетки с помощью креатина или его производных. Экспериментально доказано, что креатин оказывает нейропротекторное действие при гипоксическом повреждении тканей головного мозга у мышей [3, 9], обладает способностью подавлять оксидативный стресс, вызванный ишемией [5]. Некоторые производные креатина, в частности амиды креатина, оказывают нейропротекторное действие при ишемии головного мозга крысы [1]. Таким образом, разработка лекарственных препаратов на основе производных креатина, способных увеличить выживаемость нервных клеток в условиях ишемии, представляется важным направлением нейропротекции. Применение данных препаратов позволит уменьшить степень повреждения при ишемическом инсульте и других заболеваниях, связанных с нарушением энергетического обмена клеток головного мозга.

Цель исследования заключалась в изучении цитопротективного (нейропротекторного) действия препарата креамид (креатинилглицин этилового эфира фумарат; рис. 1) при экспериментальной ишемии/реперфузии головного мозга.

Для достижения цели была поставлена задача изучить влияние внутривенного введения креамида на выраженность повреждения головного мозга крысы при экспериментальном ишемическом инсульте.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар 14—20-недельного возраста массой 240—300 г под анестезией хлоралгидратом в дозе 430 мг/кг в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей редакцией Р. У. Хабриева (издание второе, 2005) и «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85—23, США).

Животных содержали на стандартном рационе для лабораторных крыс К-120 («Иньформ-корм», Россия) со свободным доступом к пище и воде. Креамид исследовали в дозах 50, 70, 140 и 280 мг/кг.

В качестве препарата сравнения использовался фосфокреатин (препарат неотон, Alfa Wassermann, Италия) в дозе 255 мг/кг. По данным литературы, фосфокреатин оказывает нейропротекторное действие при ишемии головного мозга у крыс [10].

Креамид и препарат сравнения вводились внутривенно за 30 мин до окклюзии левой средней мозговой артерии (СМА) в объеме 1 мл в течение 5 мин. В контрольной группе вводили 1 мл 0.9%-ного раствора NaCl в том же режиме.

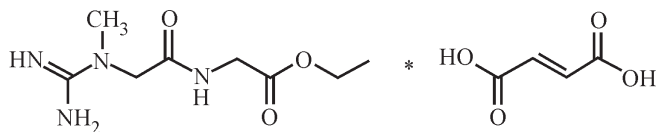


Рис. 1. Структурная формула креатинилглицин этилового эфира фумарата.

Использована модель фокальной ишемии головного мозга, основанная на окклюзии СМА, обеспечивающей основной приток крови в мозг. Эндоваскулярная окклюзия СМА выполнялась по методике J. Koizumi [4]. Крысам производился срединный разрез на шее, выделялось переднее брюшко двубрюшной мышцы, которое резецировалось, благодаря чему открывалась бифуркация общей сонной артерии. Щадящим способом выделялась наружная сонная артерия, дистальный ее сегмент перевязывался, в проксимальном отделе около бифуркации накладывалась лигатура, перевязывалась и пересекалась язычная артерия, отходящая от наружной сонной артерии. Внутренняя сонная артерия выделялась вплоть до ее бифуркации. На общую сонную артерию накладывалась клипса и производилась пункция наружной сонной артерии в изолированном сегменте. В отверстие вставлялась 3-сантиметровая монофиламентная пропиленовая нить 4—0 с окончанием, обработанным силиконом и поли-L-лизинном. Нить проводилась из наружной сонной артерии через бифуркацию во внутреннюю сонную на 20 мм, вплоть до ощущения сопротивления. Нить, введенная таким способом, перекрывает устье средней мозговой артерии, вызывая ишемию мозга. После ишемии нить извлекалась, проксимальная лигатура наружной сонной артерии затягивалась, чем предотвращалось кровотечение из пункционного отверстия. Рана ушивалась. В исследовании выбраны стандартные сроки ишемии (30 мин) и реперфузии (48 ч). В течение экспериментальной ишемии животное располагалось на столике с подогревом при температуре 37 °С.

Оценка размера повреждения производилась после умерщвления животных. Головной мозг рассекали на 5 частей для получения стандартных фронтальных срезов толщиной 2 мм. Площадь зоны повреждения выявлялась по общепринятой методике. Фронтальные срезы мозга инкубировали в 0.1%-ном растворе трифенилтетразолия хлорида (ТТС, MP Biomed., США) при температуре 37 °С в течение 15 мин. С помощью аппаратного комплекса получали цифровые фотографии передней и задней поверхности срезов, которые обрабатывались в программе ImageJ (НИН, США) для определения относительной площади повреждения для отдельной стороны каждого среза. Затем вычисляли средний показатель для каждого среза и средний показатель объема повреждения мозга. За счет значительного снижения активности НАД-зависимых дыхательных ферментов митохондрий в зоне повреждения (некроза) последняя остается бесцветной, а неизменная ткань приобретает красный цвет за счет преобразования ТТС в окрашенный продукт — формазан. Степень повреждения головного мозга оценивалась также по коэффициенту асимметрии полушарий. Изображение среза головного мозга выводилось на экран компьютера и определялось процентное отношение площади поврежденного полушария ($A_{\text{пп}}$) к площади всего фронтального среза мозга ($A_{\text{общ}}$). В предыдущих работах нами была показана точность и достоверность применения описанной методики определения повреждения головного мозга [1, 2].

Для оценки стабильности кремида в сыворотке крови к 1.5 мл сыворотки крови здоровых доноров прибавляли 50 мкл раствора кремида с концентрацией 60 мг/мл в плазмозамещающем буфере с рН 7.25 (натрия хлорид 137 мМ, калия хлорид 2.7 мМ, натрия гидрофосфат 4.7 мМ, калия дигидрофосфат 1.47 мМ, магния сульфат 1 мМ, глюкоза 5 мМ), осторожно перемешивали, инкубировали при температуре 37 °С. Белки осаждали 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты в объемном соотношении сыворотка — раствор кислоты (5 : 1), отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 6000 об/мин. Содержание кремида в надосадочном растворе определяли методом ВЭЖХ на колонке Zorbax Eclipse C18, 3.5 мкм, 3 · 100 мм. В качестве подвижной фазы использовали 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.

Статистический анализ результатов проводился с помощью программного пакета SPSS-13. Статистическая значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни для независимых выборок. Показатели представлены в виде «среднее ± стандартная ошибка среднего».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Креамид, вводимый внутривенно болюсно в дозах 50, 70, 140 и 280 мг/кг, и фосфокреатин (Неотон) в дозе 255 мг/кг хорошо переносятся животными. Нарушений дыхания, изменений цвета кожи и слизистых не отмечалось. Активность животных и течение послеоперационного периода не отличалась от таковых в

Показатели повреждения головного мозга крысы при введении креамида и фосфокреатина за 30 мин до окклюзии средней мозговой артерии

Серия	n	Показатель, %		
		$A_{\text{ип}}/A_{\text{общ}}$	$A_{\text{повр}}/A_{\text{общ}}$	$A_{\text{повр}}/A_{\text{ип}}$
Контроль-физраствор	7	50.3 ± 1.4	19.2 ± 2.7	38.2 ± 4.1
Креамид (мг/кг):				
280	7	50.2 ± 1.7	6.7 ± 1.3*	13.3 ± 3.1*
140	7	49.6 ± 1.7	8.3 ± 2.3*	16.2 ± 3.3*
70	7	51.0 ± 1.7	11.5 ± 1.6*	22.5 ± 3.0*
50	7	50.3 ± 2.3	12.9 ± 1.9*	25.6 ± 3.1*
Фосфокреатин, 255 мг/кг	6	51.0 ± 2.5	9.2 ± 1.8*	18.0 ± 2.4*

Примечание. * $p < 0.05$ относительно контроля. $A_{\text{ип}}/A_{\text{общ}}$ — процентное отношение площади поврежденного полушария к площади фронтального среза мозга (коэффициент асимметрии); $A_{\text{повр}}/A_{\text{общ}}$ — процентное отношение площади некроза к площади фронтального среза мозга (показатель повреждения для всей поверхности среза); $A_{\text{повр}}/A_{\text{ип}}$ — процентное отношение площади некроза к площади ишемизированного полушария (показатель повреждения для ишемизированного полушария).

контрольной группе (введение физиологического раствора). К моменту выведения животных из эксперимента (через 48 ч) были живы все животные.

Показатели повреждения головного мозга крыс при экспериментальной ишемии/постишемической реперфузии и внутривенном болюсном введении креамида в дозах 50, 70, 140 и 280 мг/кг и фосфокреатина (неотон) в дозе 255 мг/кг представлены в таблице.

Влияние внутривенного болюсного введения креамида $A_{\text{повр}}/A_{\text{ип}}$ имело дозозависимый характер, т. е. с повышением дозы препарата уменьшались показатели ишемического/реперфузионного повреждения головного мозга (рис. 2).

Коэффициент асимметрии ($A_{\text{ип}}/A_{\text{общ}}$) при введении креамида и фосфокреатина не изменялся, т. е. не отмечалось достоверного влияния на выраженность отека полушария головного мозга при развитии ишемического повреждения. Вероятно, это связано с особенностью формирования повреждения при данной модели ишемии головного мозга.

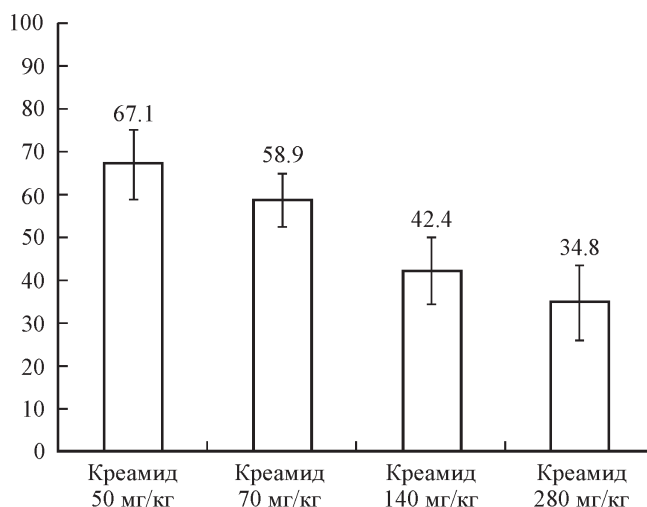


Рис. 2. Показатель повреждения в ишемизированном полушарии в зависимости от дозы креамида относительно 100 % контроля ($p < 0.05$ во всех опытных группах).

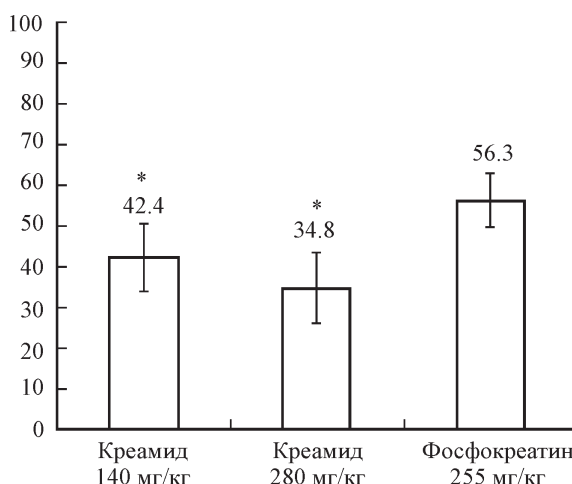


Рис. 3. Показатель повреждения в ишемизированном полушарии в процентах относительно 100 % контроля при внутривенном болюсном введении препаратов за 30 мин до окклюзии средней мозговой артерии между контрольной и опытными группами ($p < 0.05$ в опытных группах относительно контроля и препарата сравнения фосфокреатина в дозе 255 мг/кг). Нейропротекторное действие креамида в дозе 140 мг/кг также было статистически значимо выше активности фосфокреатина.

Полученные результаты показали, что введение креамида уже в дозе 50 мг/кг приводит к достоверному уменьшению объема повреждения головного мозга при окклюзии средней мозговой артерии и при увеличении дозы носило дозозависимый характер.

При сравнении нейропротективной эффективности креамида с фосфокреатином были получены данные, что повреждение головного мозга под действием креамида в дозах 140 и 280 мг/кг было меньше, чем при использовании фосфокреатина в дозе 255 мг/кг. Наиболее выраженное нейропротекторное действие оказал креамид в дозе 280 мг/кг, под действием которого степень повреждения головного мозга была на 21.5 % меньше, чем при применении фосфокреатина (рис. 3).

Необходимо отметить, что для более корректного сравнения эффективности препаратов лучше использовать молярные единицы, так как молекулярный вес препаратов различен. При пересчете дозы креамида (140 и 280 мг/кг) более выраженный нейропротекторный эффект составили 0.42 и 0.84 мМ/кг при сравнении с дозой фосфокреатина 1 мМ/кг (255 мг/кг). Таким образом, креамид по нейропротекторной активности превосходит фосфокреатин.

Для определения значимости фармакобиологической активности креамида мы исследовали его стабильность в сыворотке крови (рис. 4). Период полураспада креамида в сыворотке крови при 37 °C составляет 18 ч.

Эти данные позволяют предполагать, что активность креамида обусловлена в первую очередь его собственной активностью, а не активностью его метаболитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Креатин в работах последних лет рассматривается как нейропротектор. Так, превентивное введение креатина уменьшает ишемическое повреждение головного мозга на модели глобальной ишемии у крыс [6] и модели ишемического инсульта у мышей [9]. Среди различных механизмов гибели нейронов при ишемии

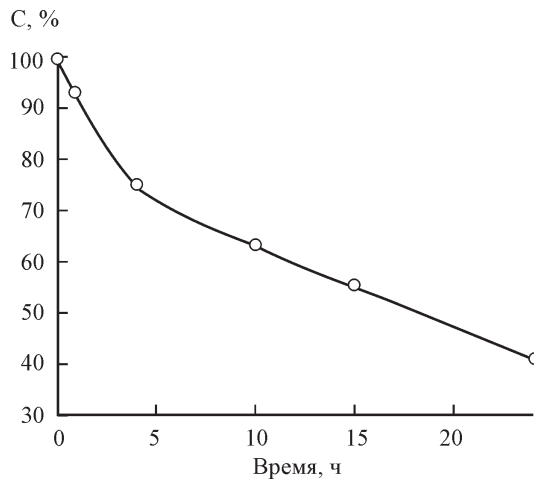


Рис. 4. Стабильность креамида в сыворотке крови.

важнейшее значение придается энергодефициту в нейронах, оксидативному стрессу, а также механизмам нарушения антиоксидантной системы. В связи с этим перспективным направлением нейропротекции при ишемических нарушениях мозгового кровообращения может считаться применение фармакологических препаратов, избирательно предотвращающих свободнорадикальные процессы и снижающих потребность головного мозга в кислороде, а также увеличивающих толерантность к ишемической гипоксии. По данным Z. Ireland и соавт. [3], поступление креатина в головной мозг незадолго до гипоксии стимулирует образование АТФ, что пролонгирует период резистентности к острому гипоксическому повреждению [3]. В опытах M. Wyss и A. Schulze [11] *in vitro* было показано, что производные креатина замедляли деполяризацию нейронов и их гиперактивацию в условиях гипоксии [11]. Кроме того, креатин обладает прямым антиоксидантным действием [5], что также может иметь значение в условиях ишемии.

В то же время поступление креатина из крови ограничено возможностями транспортной системы и проницаемостью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [7]. В связи с этим для улучшения проникновения креатина в головной мозг применяются его производные. Так, в работе L. Perasso и соавт. [8] был показан выраженный нейропротективный эффект магниевого комплекса фосфокреатина (PCr-Mg-CPLX) при парентеральном введении за 30 мин до ишемии мозга на модели окклюзии СМА у мышей, авторы связывают это с хорошим проникновением соединений креатина через ГЭБ. В настоящем исследовании мы также использовали производное креатина — фумарат этилового эфира креатинилглицина (креамид), который дозозависимо уменьшал ишемическое и реперфузионное повреждение головного мозга крысы, что предполагает его поступление в ткань головного мозга пропорционально вводимой дозе. Эти данные согласуются с нашим предположением о том, что в транспорте через ГЭБ амидов креатина могут участвовать не только транспортеры креатина, но и транспортеры аминокислот. Так, по данным, полученным нами ранее [1], было показано, что высокие дозы креатинилтирозинамида ацетата, креатинил-фенилаланинамида ацетата, креатинил-гамма-аминомасляной кислоты этилового эфира ацетата оказывают выраженное нейропротекторное действие при их внутривенном болюсном введении животным. Это предполагает их быстрое поступление в ткань мозга за счет участия других транспортных систем. Более высокая активность креамида по сравнению с фосфокреатином (препарат неотон) при ишемии головного мозга может быть связана не только с влиянием креамида на энергетический тканевой метабо-

лизм, но и с другими механизмами его действия, что требует проведения дальнейших экспериментальных исследований.

Полученные данные открывают перспективы дальнейшего изучения креамида и разработки других креатинсодержащих препаратов, эффективно уменьшающих ишемическое повреждение головного мозга. Предполагается дальнейшее изучение нейропротективного действия креамида как при использовании других доз, так и в других режимах введения, поскольку известно, что для методологической оценки эффективности применения нейропротекторов представляется целесообразным введение препаратов после развившейся ишемии, т. е. в условиях моделирования состоявшегося ишемического инсульта.

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. физ. журн. им. И. М. Сеченова. 97 (7) : 708—716. 2011.
- [2] Зухурова М. А., Старков А. В., Старовойт А. В., Барковская А. А., Власов Т. Д. Гипоксическое и фармакологическое прекодиционирование как механизмы защиты при фокальной ишемии головного мозга крысы. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 9 (3) : 84—89. 2010.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Lawler J. M., Barners W. S., Wu G., Song W., Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (1) : 47—52. 2002.
- [6] Lensman M., Korzhevskii D. E., Mourovets V. O., Kostkin V. B., Izvarina N., Perasso L., Gandolfo C. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Res.* 1114 (1) : 187—194. 2006.
- [7] 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 (11) : 1327—1335. 2002.
- [8] 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.
- [9] 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. 2007.
- [10] Tang L. H., Xia Z. Y., Zhao B., Wei X. D., Luo T., Meng Q. T. Phosphocreatine preconditioning attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of rat brain. *J. Biomed. Biotechnol.* 011 : 107091. 2011.
- [11] Wyss M., Schulze A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience*. 112 (2) : 243—260. 2002.

Поступила 15 VI 2012
После доработки 23 VII 2012