УДК 616.005.4:547.756:615.272

О. В. Багаурі, О. А. Ходаківський, Р. Г. Редькін*

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

** Національний фармацевтичний університет*

НЕЙРОЦИТОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНОГО 3,2'-СПІРО-ПІРОЛО-2-ОКСІНДОЛУ (СПОЛУКА R-86) У ПОСТРЕПЕРФУЗІЙНОМУ ПЕРІОДІ ГОСТРОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

У дослідах на монгольських піщанках (гербелах) з модельною церебральною ішемією-реперфузією (оборотна 60-хвилинна каротидна оклюзія) встановлено, що похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука R-86) при введенні у дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково в лікувальному режимі (через 1 годину після моделювання інсульту і надалі один раз на добу через кожні 24 год впродовж 4 діб) зменшує активність нейрон-специфічної енолази та рівень білка S 100 в крові. Це свідчить про нейроцитопротекторні властивості у досліджуваної сполуки. За величиною мембранопротекторного ефекту сполука R-86 переважала референт-препарат цитиколін 250 мг/кг внутрішньоочеревинно. Позитивна модулювальна дія сполуки R-86 на процеси нейродеструкції може лежати в основі його церебропротекторного ефекту.

Ключові слова: похідні 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу; ішемія-реперфузія; нейрон-специфічна енолаза; білок S 100

ВСТУП

На теперішній час одним із небагатьох лікувальних заходів, ефективність якого при гострому порушенні мозкового кровообігу (ГПМК) за ішемічним типом доведена з позицій доказової медицини, є тромболітична терапія [5]. За даними літератури [6] реперфузія при ГПМК найбільш ефективна у перші хвилини розвитку судинної катастрофи та в межах наступних 3 годин. У подальшому при її застосуванні значно зростає ризик не тільки реперфузійного ушкодження, а й геморагічних ускладнень. Враховуючи складність діагностики та проведення реканалізації, стає очевидним, що її успішне застосування можливе у небагатьох випадках і лише у великих спеціалізованих клініках [11].

Однак навіть рання реканалізація ушкодженої судини далеко не завжди виправдовує сподівання лікарів, оскільки часто після відновлення її прохідності виникають реперфузійні ушкодження нейронів та формується синдром невідновленого кровообігу. Внаслідок цього нормалізація порушених функцій головного мозку відбувається через декілька годин або навіть діб після реканалізації, а в окремих випадках тромболізис супроводжується ще більшим ураженням нервової тканини [11].

© Багаурі О. В., Ходаківський О. А., Редькін Р. Г., 2014

У зв'язку з цим схему лікування таких хворих слід доповнювати препаратами, які, впливаючи на окремі ланки патобіохімічного каскаду в нейронах, спроможні подовжити період «терапевтичного вікна» та створити захист від реперфузійного ушкодження [4, 7].

У цьому аспекті нашу увагу привернули похідні 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу. Ці сполуки виявляють високу фармакологічну активність: деяким з них притаманний ноотропний, антидепресантний, кардіопротекторний та гангліоблокувальний ефекти [12]. Серед нових похідних цього ряду, синтезованих к. фарм. н. Р. Г. Редькіним, нами знайдені сполуки з вираженими антигіпоксантними властивостями. Зокрема, сполука з лабораторним шифром R-86 при профілактичному введенні щурам вірогідно збільшує тривалість життя на моделі гострої нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією, що свідчить про наявність антигіпоксичної активності [1]. Подальше вивчення протишемчних властивостей показало, що ця сполука чинить церебропротекторний ефект в умовах гострої церебральної ішемії: зменшує летальність і неврологічний дефіцит у щурів у гострому та відновлювальному періодах, поліпшує мнестичні функції. Слід відмітити, що за величиною церебропротекторної дії похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу вірогідно перевершує цитиколін, актовегін та пірацетам.

Для поглибленого дослідження захисної дії сполуки R-86 на головний мозок при ГПМК доцільно оці-

Таблиця 1

АКТИВНІСТЬ НЕЙРОН-СПЕЦИФІЧНОЇ ЕНОЛАЗИ (NSE) У СИРОВАТЦІ КРОВІ ГЕРБЕЛ НА 4-ТУ ДОБУ ПІСЛЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ НА ТЛІ КУРСОВОЇ ТЕРАПІЇ СПОЛУКОЮ R-86 ТА ЦИТИКОЛІНОМ

Дослідні групи	Активність NSE (нг/мл)
Псевдооперовані гербели + 0,9% р-н NaCl (2 мл/кг в/о)	0,216±0,037
IP + 0,9% р-н NaCl (2 мл/кг в/о) Контрольна патологія	2,483±0,100*
IP + R-86 (10 мг/кг в/ш)	0,870±0,013*#^
IP + цитиколін (250 мг/кг в/о)	1,141±0,037*#

Примітки:
1) IP – ішемія-реперфузія; в/о – внутрішньоочеревинно; в/ш – внутрішньошлунково;
2) * – p<0,05 відносно показника псевдооперованих щурів;
3) # – p<0,05 відносно показника контрольної патології;
4) ^ – p<0,05 відносно терапії цитиколіном.

Таблиця 2

РІВЕНЬ БІЛКА S100 У СИРОВАТЦІ КРОВІ ГЕРБЕЛ НА 4-ТУ ДОБУ ПІСЛЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ НА ТЛІ КУРСОВОЇ ТЕРАПІЇ СПОЛУКОЮ R-86 ТА ЦИТИКОЛІНОМ

Дослідні групи	Рівень білка S100 (нг/мл)
Псевдооперовані + 0,9% р-н NaCl (2 мл/кг в/о)	0,452±0,047
IP + 0,9% р-н NaCl (2 мл/кг в/о) Контрольна патологія	7,616±0,646*
IP + R-86 (10 мг/кг в/ш)	1,149 ±0,046 *#^
IP + цитиколін (250 мг/кг в/о)	1,974±0,182*#

Примітки:
1) IP – ішемія-реперфузія; в/о – внутрішньоочеревинно; в/ш – внутрішньошлунково;
2) * – p<0,05 відносно показника псевдооперованих щурів;
3) # – p<0,05 відносно показника контрольної патології;
4) ^ – p<0,05 відносно терапії цитиколіном.

нити її вплив на інтенсивність перебігу деструктивних змін у мембранах нейронів за динамікою активності нейрон-специфічної енолази (NSE) та рівнем білка S 100, які є ранніми маркерами ушкодження нервової тканини. Моніторинг динаміки нейрональних маркерів в умовах гострої церебральної ішемії дозволяє не тільки дослідити глибину та ступінь ішемічного ушкодження головного мозку, а й оцінити ефективність церебропротекторної терапії [3].

Найбільш прийнятною експериментальною моделлю, що відповідає клінічним особливостям перебігу постреперфузійного періоду, є модель ішемії-реперфузії (IP) [8-10]. Зважаючи на те, що тривала гостра церебральна ішемія після відновлення кровопостачання в інфаркт-залежній судині порівняно зі звичайною моделлю незворотної білатеральної оклюзії має більш тяжкий перебіг, використання експериментальної IP дозволяє глибше оцінити величину церебропротекторної дії нових потенційних нейропротекторів і з'ясувати ефективність супровідної нейропротекторної терапії при проведенні реканалізації ураженої церебральної судини.

Метою нашого дослідження було вивчення нейроцитопротекторного ефекту похідного 3,2'-спіропіроло-2-оксіндолу (сполука R-86) як одну з можливих складових механізмів його захисної дії на ішемізований головний мозок.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для оцінки нейроцитопротекторних властивостей у похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука R-86) обрано монгольських піщанок (гербел), оскільки вони мають роз'єднане вілізієве коло кровообігу, що дозволяє об'єктивно дослідити ефективність потенційних церебропротекторів при модельному ГПМК [2].

Модель IP створювали шляхом накладання кліпси на внутрішню сонну артерію (праву) під пропофоловим наркозом («Fresenius Kabi», Австрія) 60 мг/кг внутрішньоочеревинно (в/о) терміном на 60 хв [9].

Експериментальну терапію ГПМК сполукою R-86 та референс-препаратом цитиколіном («Сомазіна» Ferrer International, S.A., Іспанія) розпочинали через 1 год після реперфузії, а далі один раз на день упродовж 4 діб. Похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу досліджували в умовно-ефективній дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) – доза, яка за результатами наших попередніх дослідження забезпечує максимальну антигіпоксичну активність сполуки R-86 [1]. Цитиколін вводили в/о в рекомендованій для доклінічних досліджень дозі 250 мг/кг [8, 9]. Гербелам групи контрольної патології виконували IP та вводили 0,9% розчин NaCI із розрахунку 2 мл/кг в/о.

Псевдооперованих гербел піддавали всім втручанням (наркозу, розрізу шкіри, препаруванню судини) за виключенням кліпсування внутрішньої сонної артерії, що нівелювало вплив травматичних умов експерименту.

Активність NSE та вміст білка S100 у сироватці крові вимірювали на 4-ту добу модельної IP методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням наборів NSE ELISA KIT (DAI, США) та S 100 ELISA KIT (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція) на приладі фірми «Hipson» (Чехія) [8].

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t Стьюдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W Уайта – за його відсутності. Відмінності вважали статистично значущими при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз динаміки активності NSE у постреперфузійному періоді ГПМК показав, що через 96 год після моделювання ішемії (4-та доба) цей показник у

групі контрольної патології (ІР + 0,9% р-н NaCl) вірогідно підвищився відносно рівня псевдооперованих тварин у 11,5 рази, що свідчить про інтенсивне формування вогнища ішемії, значну деструкцію нейронів, які знаходяться у цій зоні, та превалювання некротичного типу їх загибелі (табл. 1).

Аналіз іншого маркера ушкодження нервової тканини білка S 100 показав, що його вміст у групі контрольної патології також вірогідно зростає відносно псевдооперованих тварин у середньому в 16,8 рази (табл. 2).

На відміну від NSE, яка є внутрішньонейрональним ферментом, підвищення її активності безпосередньо вказує на ушкодження цілісності мембран нейроцитів; білок S 100 являє собою специфічний пептид астроцитарної глії, а зростання його рівня віддзеркалює запальну реакцію в гліальній тканині та вказує на інтенсивний поділ клітин нейроглії [3]. Зазначені процеси характеризують етап організації ішемічного вогнища і заміщення нейрогліальними клітинами тих нейроцитів, які загинули некротичним шляхом. Розвиток запальної реакції в нервовій тканині є прямим наслідком некрозу нейронів у вогнищі ішемії і фактором, що підтримує вторинне ушкодження нервових клітин та неконтрольовану експансію ішемічної напівтіні. Отже, аналіз отриманих даних стосовно активності NSE та рівня білка S 100 дає підставу зробити висновок про те, що у ранньому постреперфузійному періоді модельного ГПМК у гербел відбувається інтенсивне формування ядра ішемічного вогнища, яке паралельно завершується його організацією на 4-ту добу експерименту.

Експериментальна терапія гербел сполукою R-86 та цитиколіном, яку розпочинали через 1 год після церебральної ІР із подовженням лікування впродовж усього терміну спостереження, супроводжувалась зменшенням деструктивно-дегенеративних процесів в ішемізованому головному мозку тварин (табл. 1 та 2). Так, на 4-ту добу ІР сполука R-86, як і референс-препарат цитиколін, забезпечувала вірогідне зменшення відносно групи контрольної патології активності NSE в середньому відповідно у 2,9 та 2,2 рази, а вмісту білка S 100 – у 6,6 та 3,9 рази.

При цьому за зниженням активності NSE та гіперпротеїнемії S 100 сполука R-86 виявилась ефективнішою за цитиколін у середньому відповідно на 23,8% та 41,8% ($p<0,05$).

Зниження активності NSE та порівняно невисокий титр білка S 100 у сироватці крові гербел з ІР на тлі застосування сполуки R-86 може свідчити про збереження мембранної цілісності нейронів, зменшення їх некрозу, запальної реакції та як наслідок меншу активацію нейроглії.

Таким чином, оригінальне похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука R-86) виявляє церебропротекторні властивості в умовах модельної ІР, причому в механізмах її захисної дії на ішемізований головний мозок, очевидно, беруть участь нейроцитопротекторні властивості. За мембранопротекторною дією в умовах даного патологічного стану досліджувана речовина перевершує цитиколін. Перспективним є подальше вивчення можливих механізмів її церебропротекторної дії, зокрема апоптоз-модулювальних властивостей.

ВИСНОВКИ

1. Похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука R-86) виявляє церебропротекторні властивості, на що вказує зменшення активності нейрон-специфічної енолази та вмісту білка S 100 у сироватці крові гербел в умовах модельної ішемії-реперфузії головного мозку.
2. За зниженням активності енолази та рівня білка S 100 у постреперфузійному періоді гострої церебральної ішемії сполука R-86 вірогідно переважає цитиколін у середньому відповідно на 23,8% і 41,8%.
3. Механізм церебропротекторної дії сполуки R-86 пов'язаний із нейроцитопротекторними властивостями, про що свідчить вірогідне зменшення досліджуваних маркерів нейродеструкції відносно групи контрольної патології.
4. Похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука R-86) можна вважати перспективним церебропротектором.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Багаурі О. В. Скринінг антигіпоксичної активності в ряду нових похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу / О. В. Багаурі, Р. Г. Редькін, О. А. Ходаківський // Вісник фармації. – 2013. – № 2 (74). – С. 63-65.
2. Бєленічев І. Ф. Експериментальні моделі ішемії головного мозку у фармакологічних дослідженнях / [І. Ф. Бєленічев, С. В. Горбачова, Н. В. Бухтіярова та ін.] // Ліки. – 2006. – № 3-4. – С. 11-19.
3. Григорьев Е. В. Нейронспецифические белки – маркеры энцефалопатии при тяжелой сочетанной травме / [Е. В. Григорьев, Г. В. Вавин, Т. Г. Гришанова и др.] // Медицина неотложных состояний. – 2010. – № 2 (27). – С. 72-76.
4. Никонов В. В. Роль антагонистов глутаматных рецепторов (ПК-Мерц) в лечении повреждений мозга (обзор литературы) / В. В. Никонов, И. Б. Савицкая // Медицина неотложных состояний. – 2012. – № 5 (44). – С. 36-40.
5. Рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками (2008). Исполнительный комитет Европейской инсультной организации (ESO) и Авторский комитет ESO // Практична ангіол. – 2008. – № 4. – С. 9-23.
6. Соболева Е. Л. О возможных путях профилактики реперфузии при критических состояниях /

Е. Л. Соболева, Ю. П. Орлов // Сибирский мед. журн. – 2012. – № 1. – С. 13-16.

7. Трошин В. Д., Бровков Н. Н. Неотложная кардионеврология. – М: Медицинское информационное агентство, 2010. – 672 с.
8. Ходаківський О. А. Оцінка впливу експериментальної терапії адемолом на інтенсивність перебігу деструктивних змін у мембранах нейронів у монгольських піщанок в умовах гострої церебральної ішемії / О. А. Ходаківський // Вісник морфол. – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 62-65.
9. Ходаківський О. А. Дослідження впливу похідного адамантану адемолу на фрагментацію ДНК ядер нейронів лобних часток кори за ішемії-реперфузії головного мозку у щурів / О. А. Ходаківський, І. Л. Черешнюк // Укр. вісник психоневрол. – 2013. – Т. 21, № 1(74). – С. 26-28.
10. Ходаковский А. А. Особенности формирования постреперфузионного повреждения нейронов – характеристика модели «ишемия-реперфузия». Новые направления и перспективы развития современной церебропротекторной терапии ишемического инсульта / А. А. Ходаковский, Л. И. Маринич, О. В. Багаури // Врач-аспирант. – 2013. – № 3 (58). – С. 69-76.
11. Целуйко В. И. Тромболитическая терапия / В. И. Целуйко, Н. Е. Мищук // Ліки України. – 2010. – № 8 (144). – С. 8-14.
12. Штриголь С. Ю. Влияние спироцикличного производного оксиндола на кровоснабжение мозга, деструкцию нейронов и кислотно-щелочной баланс при экспериментальной церебральной ишемии / С. Ю.Штриголь, Н. А. Цубанова // Фармаком. – 2011. – № 4. – С. 60-63.

УДК 616.005.4:547.756:615.272

О. В. Багаури, А. А. Ходаковский, Р. Г. Редькин

НЕЙРОЦИТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО 3,2'-СПИРО-ПИРРОЛО-2-ОКСИНДОЛА (СОЕДИНЕНИЕ R-86) В ПОСТРЕПЕРФУЗИОННОМ ПЕРИОДЕ ОСТРОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

В опытах на монгольских песчанках (гербелах) с модельной церебральной ишемией-реперфузией (обратимая 60-минутная каротидная окклюзия) установлено, что производное 3,2'-спиро-пирроло-2-оксиндола (соединение R-86) при введении в дозе 10 мг/кг внутрижелудочно в лечебном режиме (через 1 час после моделирования инсульта и далее один раз в сутки через каждые 24 ч в течение 4 дней) уменьшает активность нейрон-специфической энолазы и уровень белка S 100 в крови. Это указывает на нейроцитопротекторные свойства исследуемого соединения. По величине мембранопротекторного эффекта соединение R-86 превосходило референс-препарат цитиколин 250 мг/кг внутрибрюшинно. Положительное модулирующее влияние соединения R-86 на процессы нейродеструкции может лежать в основе его церебропротекторного эффекта.

Ключевые слова: производные 3,2'-спиро-пирроло-2-оксиндола; ишемия-реперфузия; нейрон-специфическая энолаза; белок S 100

UDC 616.005.4:547.756:615.272

O. V. Bagauri, O. A. Khodakivskiy, R. G. Redkin

THE NEUROCYTOPROTECTIVE PROPERTIES OF 3,2'-SPIRO-PIRROLO-2-OXINDOLE DERIVATIVE (THE COMPOUND R-86) IN THE POSTREPERFUSION PERIOD OF AN ACUTE CEREBRAL ISCHEMIA

In the experiments on Mongolian gerbils (Gerbils) with a model cerebral ischemia – reperfusion (a reversible 60-minute carotid occlusion) there has been found that the derivative of 3,2'-spiro-pirrolo-2-oxindole (the compound R-86) when being administered at a dose of 10 mg/kg intragastric in a medical regimen (1 hour later after a stroke simulation and continue doing it once a day, every 24 hours for 4 days) has reduced the activity of the neuron-specific enolaza and the level of protein S 100. This indicates the neurocyteprotective properties of the studied compounds. The magnitude of the membranoprotective effect of the compound R-86 has dominated on the referent drug Citicoline 250 mg/kg intraperitoneally. A positive modeling action of the compound R-86 on the neurodestruction processes can be basis of its cerebroprotective effect.

Key words: derivatives of 3,2'-spiro-pirrolo-2-oxindole; ischemia-reperfusion; neuron-specific enolaza; protein S 100

Адреса для листування:
21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.
Моб. тел. 0976646187. E-mail: olga.bagauri@yandex.ua.
Вінницький національний медичний університет
ім. М. І. Пирогова

Надійшла до редакції 17.01.2014 р.