

**К. В. Александрова, І. Ф. Беленічев, С. В. Левіч, Д. М. Юрченко,
О. С. Шкода, С. Г. Носач**
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОШУК НЕЙРОПРОТЕКТОРІВ З ЕНЕРГОТРОПНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ В РЯДУ ПОХІДНИХ КСАНТИНУ

У статті наведено результати дослідження енерготропної дії потенційних нейропротекторних сполук – похідних ксантину С-3 та С-4 порівняно з референс-препаратом мексидолом на моделі ішемічного інсульту, яку відтворювали шляхом двобічного перев'язування загальних сонних артерій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: похідні ксантину, ішемічний інсульт, енерготропна дія.

ВСТУП. Гострі порушення мозкового кровообігу (ГПМК) є лідируючим фактором загальної смертності населення промислово розвинених країн світу. Вони посідають третє місце за розповсюдженістю в країнах Європи та Американського континенту, поступаючись лише серцево-судинним патологіям та злоякісним новоутворенням [12].

Важливу роль у порушенні когнітивних та асоціативних функцій при ішемічному інсульті відіграють виражені структурні зміни тканин головного мозку, пов'язані з пригніченням процесів біоенергетики, розвитком глутаматної "ексайтотоксичності" та гіперпродукцією активних форм кисню (АФК) [8, 11].

За умов гострої мозкової гіпоксії (на тлі зниження активності антиоксидантної системи захисту нейрона) накопичення АФК призводить до надлишкового утворення NO-радикала, що викликає інгібування дихального ланцюга мітохондрій, ферментів циклу Кребса та, як наслідок, зниження синтезу й виснаження запасів АТФ і загибель нейронів шляхом апоптозу або некрозу. NO-радикал реагує із супероксид-аніоном, що синтезується при кисневому дефіциті, з утворенням високо-токсичного пероксинітрит-радикала. За механізмом ланцюгової реакції вільнорадикальні субстрати, що утворилися, прискорюють загибель нейронів шляхом пригнічення активності залізо-сірчаних ферментів циклу Кребса та ланцюга перенесення електронів [9, 10]. Наслідком дефіциту кисню є дисфункція міто-

хондріального апарату, що проявляється послідовними фазними змінами активності мітохондріальних ферментних комплексів та призводить до пригнічення аеробного синтезу енергії, енергозалежних функцій і метаболізму клітин [6, 10].

У попередніх роботах показано нейропротекторні властивості похідних ксантину С-3 та С-4 [1, 3]. Продовжуючи ці дослідження, необхідно було вивчити їх вплив на показники енергетичного обміну в нейронах на тлі ГПМК. З огляду на вищенаведене, мета даного дослідження – вивчення енерготропних властивостей та впливу на енергетичний обмін похідних ксантину С-3 та С-4 за умов гострого порушення мозкового кровообігу в щурів порівняно з референс-препаратом мексидолом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експеримент проводили з використанням моделі неповної глобальної ішемії головного мозку, яку відтворювали шляхом двобічного перев'язування загальних сонних артерій.

Дослідження виконано на білих щурах лінії Вістар обох статей масою 220–260 г. Усі тварини перебували на стандартному раціоні харчування виварію, за природної зміни дня і ночі. Щурів отримано з розплідника ІФТ України. Усі експериментальні процедури та операційні втручання здійснювали згідно з Положенням про використання лабораторних тварин у біомедичних дослідженнях.

Двобічне перев'язування загальних сонних артерій виконували під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) із використанням хірур-

гічного доступу шляхом виділення сонних артерій та одномоментним накладанням на них шовкової лігатури [5].

Досліджувані сполуки протягом усього експерименту вводили раз на добу внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда в дозі 100 мг/кг, мексидол (еталон порівняння) – за тією ж схемою в дозі 250 мг/кг внутрішньошлунково. У групі інтакту (псевдооперованих тварин) було 5 щурів, у контрольній та в групі тварин, які отримували лікування, прооперовано 15 щурів [1].

Для біохімічних досліджень тканини мозку гомогенізували на холоді, в сольовому ізотонічному середовищі 1:10 (0,15 М КСl) при температурі +4 °С, за допомогою скляного гомогенізатора. Методом диференційного центрифугування виділялась цитозольна фракція (15 000 г). Екстракт, позбавлений білків, отримували шляхом додавання точної наважки гомогенату тканини мозку в 0,6 М розчині НСlO₄ з наступною нейтралізацією 5,0 М розчином калій карбонату [7].

Аденілові нуклеотиди визначали методом тонкошарової хроматографії [7]. Метод базується на розділенні АТФ, АДФ та АМФ у системі діоксан–пропанол-2–вода–аміак (4:2:4:1) в тонкому шарі сорбенту з наступним кількісним визначенням методом прямої спектрофотометрії при 260 нм.

Для поглибленого аналізу стану енергозабезпечення нейронів за умов ГПМК було розраховано такі показники енергетичного обміну: енергетичний заряд (ЕЗ), енергетичний потенціал (ЕП), коефіцієнт порівняння (КП), індекс фосфорилування (ІФ) та показник термодинамічного контролю дихання (ТКД) [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Двобічне перев'язування загальних сонних артерій призвело до дисбалансу пулу макроергічних фосфатів у тканинах головного мозку щурів з ГПМК (табл. 1), що відповідає клінічним проявам ішемічного інсульту [6, 11].

Поглиблений аналіз стану енергозабезпечення показав, що двобічне перев'язування загальних сонних артерій викликало зниження інтенсивності та ефективності фосфорилування аденілонуклеотидної системи (табл. 2).

Так, показник енергетичного заряду в контрольній групі зменшувався на 12 % порівняно з інтактною групою, що відображає суттєве зниження ступеня заповнення макроергічними зв'язками системи АТФ–АДФ–АМФ. На фоні використання похідних ксантину відмічали збільшення ЕЗ до рівня інтактних тварин. В дії мексидолу відзначали схожий за направленістю, проте менш виражений, ефект.

Вивчення енергетичного потенціалу показало його збільшення в контрольній групі у гострий період експериментальної ішемії на 17,5 %, що свідчить про активацію дихального ланцюга мітохондрій та корелює зі змінами вмісту компонентів аденілонуклеотидного пулу [2]. Експериментальна терапія антиоксидантами (мексидол та похідні ксантину С-3 і С-4) привела до корекції мітохондріальних порушень та зниження ЕП до рівня інтакту і нижче, що пояснюється стабілізуючим впливом досліджуваних речовин на мітохондріальне дихання.

Аналогічні зміни відзначено при аналізі показника коефіцієнта порівняння, який відображає співвідношення суми АТФ та АМФ до АДФ. КП у контрольній групі збільшувався

Таблиця 1 – Вплив сполук С-3 та С-4 на вміст аденілових нуклеотидів у головному мозку тварин на 4 добу після ГПМК

Група тварин	АТФ, мкмоль/г тканини	АДФ, мкмоль/г тканини	АМФ, мкмоль/г тканини
Інтакт	2,01±0,12	0,53±0,005	0,12±0,003
Контроль	1,07±0,07	0,24±0,003	0,27±0,002
С-3	1,82±0,05*	0,50±0,003*	0,12±0,02
С-4	1,62±0,07*	0,47±0,004*	0,11±0,004*
Мексидол	1,33±0,12*	0,44±0,005*	0,15±0,011*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – p≤0,05 відносно контролю.

Таблиця 2 – Вплив сполук С-3 та С-4 на показники енергозабезпечення в головному мозку тварин на 4 добу після ГПМК

Група тварин	ЕЗ	ЕП	КП	ІФ	ТКД
Інтакт	0,855±0,005	3,792±0,191	4,018±0,193	3,092±0,146	4,416±0,069
Контроль	0,753±0,009	4,458±0,235	5,583±0,231	2,098±0,116	0,888±0,005
С-3	0,848±0,004*	3,640±0,077*	3,880±0,117*	2,935±0,028*	4,166±0,72*
С-4	0,843±0,003*	3,446±0,112*	3,680±0,126*	2,793±0,082*	4,272±0,112*
Мексидол	0,807±0,006*	3,022±0,237*	3,363±0,259*	2,254±0,141*	2,933±0,181*

на 38,9 %, що зумовлено зростанням рівня АМФ та переважанням прямої реакції перетворення АДФ над зворотною. Введення сполук С-3, С-4 та мексидолу приводило до зменшення рівня КП на 30,5, 34,1 та 39,7 % відповідно порівняно з контролем, що підтверджує позитивний вплив даних речовин на стабілізацію мітохондріального дихання та корекцію енергетичного дисбалансу.

Аналіз показників індексу фосфорилування в тканинах мозку тварин з ГПМК дозволив встановити порушення співвідношення між АТФ та пулом АДФ-АМФ у контрольній групі тварин (зниження ІФ на 32,1 %). У тканинах мозку щурів, які одержували сполуки С-3 та С-4, ІФ значно збільшувався, що вказує на корекцію дисбалансу співвідношення окремих макроергічних фосфатів на моделі церебральної ішемії. Слід зазначити, що стабілізувальний вплив на показники ІФ похідних ксантину перевищував за силою ефект мексидолу.

Показник термодинамічного контролю дихання, який відображає залежність активності дихального ланцюга мітохондрій від концентрації окремих компонентів аденілонуклеотидної системи та інтенсивності фосфорилування в цілому, був знижений у головному мозку щурів з ГПМК майже в 5 разів. На фоні введення мексидолу в експериментальних тварин відмічено достовірне збільшення ТКД на 230 %, але порівняно з інтактним показником зберігалось його зменшення в 1,5 раза. Стабілізувальний вплив похідних ксантину на

показник ТКД перевищував за силою мексидолу.

Таким чином, аналіз одержаних результатів показав, що похідні ксантину С-3 та С-4 стабілізували енергетичний стан клітин головного мозку тварин з ГПМК, що підтверджувалося зростанням рівнів АТФ та АДФ на тлі зниження вмісту АМФ. Аналіз додаткових параметрів енергозабезпечення свідчить про те, що досліджувані сполуки підвищують ступінь заповнення системи АТФ–АДФ–АМФ макроергічними зв'язками, активують прямі реакції синтезу АТФ, корегують дисбаланс співвідношення макроергічних фосфатів та інтенсивність фосфорилування аденілонуклеотидної системи в цілому, що вказує на наявність у досліджуваних речовин енерготропного ефекту за умов ішемії. Порівняльний аналіз активності мексидолу та сполук С-3 і С-4 виявив більш ефективну корекцію рівнів АТФ, АДФ та АМФ у групах похідних ксантину, що свідчить про їх виражену енерготропну дію.

ВИСНОВКИ. На моделі ішемічного інсульту (шляхом двобічного перев'язування загальних сонних артерій) доведено наявність у похідних ксантину С-3 та С-4 вираженої енерготропної дії, що за силою перевищує дію референс-препарату мексидолу, це свідчить про значну церебропротекторну активність досліджуваних препаратів та є експериментальним підґрунтям для подальшого пошуку нейропротекторів з енерготропним ефектом у ряді похідних ксантину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вивчення антиоксидантної активності та церебропротективної дії похідного 3-метилксантину – сполуки С-4 – в умовах двосторонньої перев'язки загальних сонних артерій (ішемічний інсульт) / І. Ф. Беленічев, Д. М. Юрченко, К. В. Александрова [та ін.] // Запороз. мед. журн. – 2012. – № 5 (74). – С. 8–11.
2. Влияние тиотриазолина, глицина, магния и их комбинации на ответ генома и показатели антиоксидантной системы в коре головного мозга крыс с церебральной ишемией / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленічев, Е. Л. Левицкий [и др.] // Совр. пробл. токсикол. – 2007. – № 3. – С. 61–65.
3. Исследование мембранопротекторных свойств и влияния на энергетический обмен нейроннов нового производного ксантина С-3 в условиях развития глобальной ишемии головного мозга /

- Е. В. Александрова, Д. Н. Юрченко, Н. И. Романенко [и др.] // Укр. біофармац. журн. – 2013. – № 4 (27). – С. 54–58.
4. Мецлер Д. Биохимия : в 3 т. / Д. Мецлер. – М. : Мир, 1980. – Т. 2 : Химические реакции в живой клетке. – 606 с.
5. Поварова О. В. Влияние фенил-*t*-бутилнитрона, мексидола и нооглютила на зону поражения мозга и память крыс после окклюзии средней мозговой артерии / О. В. Поварова, Т. Л. Гаритова, Е. И. Каленикова // Эксперим. и клин. фармакол. – 2004. – **67**, № 1. – С. 3–6.
6. Скворцова В. И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии / В. И. Скворцова // Инсульт. – 2003. – № 9. – С. 20–22.

7. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.

8. Allen C. L. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischemic stroke / C. L. Allen, U. Bayraktutan // Int. J. Stroke. – 2009. – № 4. – P. 461–470.

9. Buttini M. Induction of interleukin-1 β mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat / M. Buttini, A. Sauter, H. W. Boddeke // Mol. Brain Res. – 1994. – № 23. – P. 126–134.

10. Functional role of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis / R. M. Friedlander, V. Gardliardini, R. J. Rotello, H. Yuan // J. Exp. Med. – 1996. – № 184. – P. 717–724.

11. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke / T. M. Woodruff, J. Thundyil, S. C. Tang [et al.] // Mol. Neurodegener. – 2011. – № 6. – P. 11–29.

12. World Health Organization World Health Report 2010, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

**Е. В. Александрова, И. Ф. Беленичев, С. В. Левич, Д. Н. Юрченко,
А. С. Шкода, С. Г. Носач**
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ПОИСК НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ С ЭНЕРГОТРОПНЫМИ СВОЙСТВАМИ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ КСАНТИНА

Резюме

В статье приведены результаты исследования энерготропного действия потенциальных нейропротекторных соединений – производных ксантина С-3 и С-4 в сравнении с референс-препаратом мексидолом на модели ишемического инсульта, которую воспроизводили путем двусторонней перевязки общих сонных артерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: производные ксантина, ишемический инсульт, энерготропное действие.

**K. V. Aleksandrova, I. F. Bielenichev, S. V. Levich, D. M. Yurchenko,
O. S. Shkoda, S. H. Nosach**
ZAPORIZHZHYA STATE MEDICAL UNIVERSITY

SEARCH OF NEUROPROTECTORS WITH ENERGETROPIC PROPERTIES AMONG DERIVATIVES OF XANTHINE

Summary

The results of research of energotropic action of potential neuroprotectors – derivatives of xanthine C-3 and C-4, in comparison with reference-drug mexidol on the model of ischemic stroke, that was produced by bilateral ligation of common carotid arteries are described in this article.

KEY WORDS: xanthine derivatives, ischemic stroke, energotropic action.

Отримано 29.07.14

Адреса для листування: К. В. Александрова, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.