

УДК 616.8:612.826.33.015.22:615.22

*І.І. Заморський*

*Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці*

## **ПОТЕНЦІЮВАННЯ АНТИГІПОКСАНТНИХ ЕФЕКТІВ МЕЛАТОНІНУ ДИПІРИДАМОЛОМ**

Дослідження проведені на статевонезрілих (у віці 5–6 тижнів) самцях безпородних білих щурів масою 65–75 г, попередньо відібраних на середню стійкість до гіпоксії. Гостру гіпоксію моделювали шляхом «підйому» тварин на «висоту» 12000 м. На «висотному плато» щурів витримували до оборотної зупинки дихання, після цього здійснювали «спуск» на попередню нульову висоту. Мелатонін і дипіридамол вводили внутрішньоочеревинно в дозах відповідно 1 і 5 мг на 1 кг маси тіла за 30 хв до моделювання гіпоксії. Нейропротекторні ефекти мелатоніну і дипіридамолу при гострій гіпоксії оцінювали за показниками інтенсивності ліпідної і білкової пероксидації, а також за активністю ферментативного маркера плазматичних мембран нейронів  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФази в головному мозку щурів. Встановлено, що застосування дипіридамолу на тлі введення мелатоніну при гострій гіпоксії потенціює антиоксидантні ефекти мелатоніну щодо утворення продуктів пероксидації — як ліпідної (малонового діальдегіду), так і білкової (особливо продуктів основного характеру).

**Ключові слова:** мелатонін, дипіридамол, аденозин, гостра гіпобарична гіпоксія, ліпідна і білкова пероксидація, нейропротекція, щури.

Одним із основних напрямків фармакологічної корекції гіпоксичного синдрому є зменшення вільнорадикальних процесів, стабілізація клітинних мембран і відновлення окисно-антиоксидантного гомеостазу за допомогою антиоксидантної терапії [1]. За останні десятиліття встановлено, що гормон шишкоподібного тіла мелатонін є одним з найсильніших ендогенних антиоксидантів з багатьма цитопротекторними ефектами [2, 3]. Його антиоксидантна дія перевищує дію токоферолу удвічі, аскорбату – в 1,8 раза, а такого відомого ендогенного антиоксиданту, як глутатіон, утричі [4]. Одна молекула мелатоніну здатна знешкоджувати до 10 вільних радикалів [5], протидіючи як активним формам кисню, так і активним формам азоту [6]. В організмі експериментальних тварин мелатонін посилює антиоксидантну активність глутатіонової системи, стимулюючи глутатіонпероксидазу та збільшуючи вміст відновленого глутатіону [3]. Цей гормон розглядають як один з ефективних нейропротекторів [7, 8], який проявляє захисну дію при гострій гіпоксії [9]. Нашими попередніми дослідженнями теж доведена нейропротекторна і антигіпоксанта активність мела-

тоніну за умов гострої гіпобаричної гіпоксії критичного рівня. Разом з іншими речовинами в головному мозку присутній нейромедіатор аденозин, який, згідно даних літератури, також проявляє антигіпоксанта ефекти [10, 11]. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження нейропротекторного впливу мелатоніну і дипіридамолу (інгібітора нейронального захоплення аденозину [12]) при їх одночасному застосуванні за умов гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії.

**Матеріал і методи.** Дослідження проведені на 48 статевонезрілих (віком 5–6 тижнів, ювенільний вік) самцях безпородних білих щурів масою 65–75 г. За два тижні до початку досліджень визначали чутливість щурів до гіпоксії [13] і в подальшому використовували лише середньостійких до гіпоксії тварин. Гостру гіпобаричну гіпоксію моделювали шляхом «підйому» тварин на «висоту» 12 000 м зі швидкістю 58 мм рт. ст. за 1 хв при 22 °С. На «висотному плато» щурів витримували до оборотної зупинки дихання, після цього здійснювали «спуск» на попередню нульову висоту, відновлюючи нормальний атмосферний тиск і життєдіяльність тварин. Препарати (мелатонін, розчинений в

© І.І. Заморський, 2016

0,1%-вому розчині етанолу, та дипіридамолю вводили внутрішньоочеревинно в дозах відповідно 1 та 5 мг на 1 кг маси тіла за 30 хв до моделювання гострої гіпоксії. Контрольним тваринам вводили еквівалентну кількість розчинника. Усі маніпуляції проводили у відповідності до Директиви Європейського союзу 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються в наукових цілях [14]. Нейропротекторні ефекти мелатоніну і дипіридамолю оцінювали через 30 хв після припинення дії гострої гіпоксії або через 1 год після введення досліджуваних речовин за показниками інтенсивності ліпідної і білкової пероксидації та за активністю маркера плазматичних мембран нейронів в корі (переважно фронтальна частина) великих півкуль головного мозку щурів. Активність пероксидації ліпідів оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА), який визначали за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою, а пероксидації білків — за вмістом продуктів окисної модифікації білків, що визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразиним з утворенням гідразонів характерного спектра поглинання при 370 нм (продукти нейтрального характеру) та 430 нм (продукти основного характеру) [15, 16]. Активність  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФази як маркерного ферменту

плазматичних мембран нейронів та мішені для дії вільних радикалів [17] визначали за збільшенням в ході реакції кількості неорганічного фосфату ( $\text{P}_i$ ) [18, 19] і виражали в нмоль  $\text{P}_i$  на 1 мг білка. Рівень  $\text{P}_i$  визначали колориметричним методом [20], вміст білка – методом О. Н. Lowry et al. [21]. Отримані цифрові дані статистично обробили. Достовірність різниці між показниками оцінювали з використанням параметричного t-критерію Стьюдента (при нормальному розподілі даних) і непараметричного U-критерію Манна–Уїтні (при невідповідності нормальному розподілу). Нормальність розподілу даних оцінювали за тестом Колмогорова–Смирнова. Критичний рівень статистичної значущості був прийнятий за  $p \leq 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Отримані дані про вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів і білків та активність маркерного ферменту плазматичних мембран нейронів в корі великих півкуль головного мозку щурів при гострій гіпобаричній гіпоксії на фоні введення мелатоніну і дипіридамолю наведені в таблиці.

Встановлено, що після гострої гіпоксії в корі великих півкуль головного мозку тварин реєструються наслідки окисного стресу зі збільшенням утворення продуктів як ліпідної,

*Вплив мелатоніну і дипіридамолю на активність  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФази та вміст малонового діальдегіду і продуктів окисної модифікації білків у корі великих півкуль головного мозку ювенільних щурів при гострій гіпоксичній гіпобаричній гіпоксії ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )*

Характер впливу	$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФаза, мкмоль $\text{P}_i$ за хв на мг білка	МДА, мкмоль на 1 г тканини	Продукти, ммоль 2,4-динітрофенілгідразин на 1 г білка	
			нейтрального характеру	основного характеру
Контроль	0,44±0,040	41,1±4,08	2,30±0,110	1,32±0,127
Гіпоксія	0,34±0,020*	60,1±4,55*	3,07±0,220*	1,80±0,165*
Мелатонін	0,48±0,022	44,3±2,87	2,59±0,193	1,49±0,107
Мелатонін+гіпоксія	0,54±0,018**	38,2±3,78**	2,34±0,298**	1,41±0,180**
Дипіридамолю	0,42±0,044	34,5±3,87	2,58±0,259	1,45±0,134
Дипіридамолю+гіпоксія	0,32±0,034*	50,4±5,50#	2,58±0,245	1,77±0,189
Мелатонін + дипіридамолю	0,52±0,020	44,7±3,93	2,39±0,266	1,51±0,168
Мелатонін + дипіридамолю і гіпоксія	0,54±0,024##	30,0±2,14****	2,43±0,217**	1,36±0,116**

*Примітка.*  $p < 0,05$ ; \* зміни вірогідні в порівнянні з даними у контрольних тварин, \*\*зміни вірогідні відносно даних у тварин за умов гіпоксії без введення мелатоніну або дипіридамолю; \*\*\*зміни вірогідні відносно показників у тварин, яким вводили мелатонін, за умов гіпоксії; # зміни вірогідні відносно показників у тварин, яким вводили дипіридамолю,  $p < 0,05$ ; ## зміни вірогідні відносно показників у тварин за умов гіпоксії при введенні дипіридамолю.

так і білкової пероксидації, а також з пригніченням активності  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФази – ключового ферменту збудливості нейронів, вивільнення і поглинання катехоламінів і серотоніну [22, 23]. Такі зміни в тканині переднього мозку у відповідь на гіпоксію критичного рівня узгоджуються з даними літератури [23]. Застосування мелатоніну при гіпоксії демонструє виражений нейропротекторний ефект від цього антиоксиданту і цитопротектора, зменшуючи утворення продуктів ліпідної і білкової пероксидації та посилюючи активність ключового ферменту нейронів  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФази. Отримані дані узгоджуються з нейропротекторними ефектами мелатоніну при гострій гіпоксії, що продемонстровані іншими авторами у дослідженнях як *in vitro* [9], так і *in vivo* [24]. Водночас застосування дипіридамолу при гострій гіпоксії суттєво не впливає на утворення продуктів пероксидації ліпідів і білків, а також на активність ключового нейронального ферменту  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФази порівняно з даними у тварин без застосування цього антитромботичного і судиннорозширювального засобу. Отримані нами дані вказують на відсутність у дипіридамолу захисних ефектів при екзогенній гіпоксії. Разом з цим, застосування

дипіридамолу на фоні введення мелатоніну при гострій гіпоксії потенціуює антиоксидантні ефекти мелатоніну, зокрема щодо утворення продуктів як ліпідної пероксидації (малонного діальдегіду), так і білкової (особливо продуктів основного характеру).

#### Висновки

Застосування дипіридамолу на фоні введення мелатоніну при гострій гіпоксії потенціуює антигіпоксанти ефекти мелатоніну, зокрема антиоксидантні щодо утворення продуктів ліпідної і білкової пероксидації в головному мозку щурів.

**Перспективність дослідження.** Враховуючи хороший профіль безпеки мелатоніну як лікарського засобу та високу біодоступність при пероральному застосуванні, цей гормон можна розглядати як ефективний антигіпоксанти, нейропротектор і взагалі цитопротектор для лікування багатьох захворювань, що супроводжуються розвитком гіпоксії як типового патологічного процесу. Крім того, отримані результати дають підстави для розширення клінічного застосування дипіридамолу разом з мелатоніном, а також дослідження можливих аденозинзалежних механізмів цитопротекторних ефектів мелатоніну.

#### Література

1. Лукьянова Л.Д. Энерготропное, антигипоксическое и антиоксидантное действие флавоноидов / Л.Д. Лукьянова, Э.Л. Германова, А.И. Лыско // Вестник РАМН. – 2007. – № 2. – С. 55–61.
2. Reiter R.J. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart / R.J. Reiter, D.X. Tan // Cardiovasc Res. – 2003. – Vol. 58, № 1. – P. 10–19.
3. Reiter R.J. Melatonin: exceeding expectations / R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano // Physiology (Bethesda). – 2014. – Vol. 29, № 5. – P. 325–333.
4. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E / C. Pieri, M. Marra, F. Moroni, et al. // Life Sci. – 1994. – Vol. 55, № 15. – P. PL271–PL276.
5. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism / D.X. Tan, L.C. Manchester, E. Esteban-Zubero, et al. // Molecules. – 2015. – Vol. 20, № 10. – P. 18886–18906.
6. Sanchez A. Evaluating the oxidative stress in inflammation: role of melatonin / A. Sanchez, A.C. Calpena, B. Clares // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – Vol. 16, № 8. – P. 16981–17004.
7. Naseem M. Role of melatonin in traumatic brain injury and spinal cord injury / M. Naseem, S. Parvez // Scientific World J. – 2014. – Vol. 2014. – Article ID 586270, 13 p. doi: 10.1155/2014/586270
8. Watson N. Melatonin as an antioxidant for stroke neuroprotection / N. Watson, T. Diamandis, C. Gonzales-Portillo, et al. // Cell Transplant. – 2016. – Vol. 25, № 5. – P. 883–891.
9. Melatonin restores the cytochrome oxidase reactivity in the nodose ganglia of acute hypoxic rats / H.M. Chang, C.Y. Tseng, I.H. Wei, et al. // J. Pineal Res. – 2005. – Vol. 39, № 2. – P. 206–214.
10. Суфианова Г.З. Нейропротекторное действие агонистов аденозиновых рецепторов при фокальных ишемических и травматических повреждениях ЦНС: автореф. дис. ... докт. мед. наук / Г.З. Суфианова. – С.-Пб., 2003. – 419 с.

11. Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage / O. Bjorklund, M. Shang, I. Tonazzini, et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 596. – P. 6–13.
12. Dipyridamole monotherapy in schizophrenia: pilot of a novel treatment approach by modulation of purinergic signaling / I. Wonodi, H.V. Gopinath, J. Liu, et al. // *Psychopharmacology (Berl.)* – 2011. – Vol. 218, № 2. – P. 341–345.
13. *Березовский В.А.* Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности / В.А. Березовский. – К.: Наук. думка, 1978. – 216 с.
14. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Text with EEA relevance // *O. J. L* 276. – Vol. 53, 20.10.2010. – P. 33–79.
15. *Арутюнян А.В.* Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. рекомендации / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – С.-Пб.: Фолиант, 2000. – 53 с.
16. *Мецишен І.Ф.* Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І.Ф. Мецишен // *Буковинськ. мед. вісник.* – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156–158.
17. *Капля А.А.* Структурная организация изоферментов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>АТФазы в плазматической мембране / А.А. Капля // *Укр. биохим. журн.* – 1997. – Т. 69, № 5–6. – С. 12–24.
18. *Israelsson B.* Changes in adenylate cyclase and 5' nucleotidase activities in liver membranes from alloxan diabetic rats / B. Israelsson, I. Tengrup // *Experientia.* – 1980. – Vol. 36, № 2. – P. 257–258.
19. *Robinson J.D.* Interaction between monovalent cations and the (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-dependent adenosine triphosphatase / J.D. Robinson // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1970. – Vol. 139, № 1. – P. 17–27.
20. *Fiske S.* The colorimetric determination of phosphorus / S. Fiske, J. Subbarow // *J. Biol. Chem.* – 1925. – Vol. 66, № 7. – P. 375–400.
21. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
22. *Лелевич В.В.* Особенности энергетического обмена в ткани головного мозга / В.В. Лелевич // *Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 1996. – № 2. – С. 113–119.
23. *Shagirtha K.* Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats / K. Shagirtha, M. Muthumani, S.M. Prabu // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2011. – Vol. 15, № 9. – P. 1039–1050.
24. Mechanisms of melatonin-induced protection in the brain of late gestation fetal sheep in response to hypoxia / T. Yawno, M. Castillo-Melendez, G. Jenkin, et al. // *Dev. Neurosci.* – 2012. – Vol. 34, № 6. – P. 543–551.
25. *Tan D.-X.* Ebola virus disease: potential use of melatonin as a treatment / D.-X. Tan, A. Korkmaz, R.J. Reiter, et al. // *J. Pineal Res.* – 2014. – Vol. 57, № 4. – P. 381–384.

### ***И.И. Заморский***

#### **ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИГИПОКСАНТНЫХ ЭФФЕКТОВ МЕЛАТОНИНА ДИПИРИДАМОЛОМ**

Исследования проведены на неполовозрелых (в возрасте 5–6 недель) самцах беспородных белых крыс массой 65–75 г, предварительно отобранных на среднюю устойчивость к гипоксии. Острую гипоксию моделировали путем «подъема» животных на «высоту» 12000 м. На «высотном плато» крыс выдерживали до обратимой остановки дыхания, после чего осуществляли «спуск» на предыдущую нулевую высоту. Мелатонин и дипиридамолом вводили внутривентриально в дозах соответственно 1 и 5 мг на 1 кг массы тела за 30 мин до моделирования гипоксии. Нейропротекторные эффекты мелатонина и дипиридамола при острой гипоксии оценивали по показателям интенсивности липидной и белковой перекисидации, а также по активности ферментативного маркера плазматических мембран нейронов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>АТФазы в головном мозге крыс. Установлено, что применение дипиридамола на фоне введения мелатонина при острой гипоксии потенцирует антиоксидантные эффекты мелатонина относительно образования продуктов перекисидации — как липидной (малонового диальдегида), так и белковой (особенно продуктов основного характера).

**Ключевые слова:** мелатонин, дипиридамолом, аденозин, острая гипобарическая гипоксия, липидная и белковая перекисидация, нейропротекция, крысы.

**I.I. Zamorskii**

**POTENTIATION OF NEUROPROTECTIVE ANTIHYPOXIC EFFECTS OF MELATONIN WHILE ADMINISTERING DIPYRIDAMOLE**

The study was conducted on nonpubertal (aged 5–6 weeks) outbred male white rats weighing 65–75 g, pre-selected for medium resistance to hypoxia. Acute hypoxia was simulated by «lifting» the animals to the «height» of 12 000 m. The rats were kept on the «high-altitude plateau» to the reverse respiratory standstill, then a «descent» to the previous zero height was done. Melatonin and dipyridamole were administered intraperitoneally at doses of 1 and 5 mg per 1 kg of body weight respectively 30 minutes before hypoxia was simulated. Neuroprotective effects of melatonin and dipyridamole in acute hypoxia were evaluated by the indices of intensity of lipid and protein peroxidation, as well as by the activity of enzyme marker of neuronal plasma membranes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPhase) in the brain of rats. It was established that the use of dipyridamole against the background of melatonin administration in acute hypoxia potentiates antioxidant effects of melatonin for the formation of products lipid peroxidation (malondialdehyde) and of protein peroxidation (especially basic character products).

**Key words:** *melatonin, dipyridamole, adenosine, acute hypobaric hypoxia, lipid and protein peroxidation, neuroprotection, rats.*

*Поступила 05.05.16*