

І. Ф. Бєленічев, С. В. Павлов, Л. І. Кучеренко, І. А. Мазур

## Енерготропний механізм церебропротективної дії нового оригінального препарату «Лізиній» за умов моделювання гострого порушення мозкового кровообігу

Запорізький державний медичний університет  
НВО «Фарматрон»

*Ключові слова:* церебральна ішемія, енергетичний метаболізм, Лізиній

Інсульт та хронічні форми судинної мозкової недостатності є однією з найактуальніших проблем сучасної неврології. За епідеміологічними даними захворюваність інсультом у світі складає 150 випадків на 100 тис. населення на рік, що зумовлює велику значущість розробки ефективних засобів захисту від гіпоксії [1]. Фармакологічні засоби, дія яких спрямована на підвищення стійкості організму до дефіциту кисню, почали застосовувати водночас з розвитком уявлень щодо патофізіологічних і біохімічних механізмів пристосування організму до кисневої недостатності [2]. Різноманітність патофізіологічних, біохімічних змін при гіпоксії зумовила застосування як антигіпоксантів фармакологічних сполук різного типу дії, серед яких регулятори гемодинаміки, блокатори кальцієвих каналів, препарати центрального типу дії, стабілізатори мембран, антиоксиданти [2, 3].

Водночас експериментальними та клінічними дослідженнями останнього десятиріччя продемонстровано серед антигіпоксантів перевагу препаратів з метаболітотропним типом дії, здатних попереджати розвиток енергодефіциту та оксидативного стресу [4, 5]. До таких препаратів можна віднести синтезований на кафедрі фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету новий лікарський засіб оригінальної структури – L-лізиній 1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат з робочою назвою «Лізиній», який містить структурні фрагменти тіотріазоліну та L-лізину есцинату. У попе-

редніх дослідженнях *in vivo* та *in vitro* було продемонстровано здатність Лізинію проявляти антиоксидантну та ендотеліотропну дію [6–8].

*Мета дослідження* – вивчення впливу Лізинію на енергетичні ланцюги нейродеструкції за умов моделювання гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК).

*Матеріали та методи.* Експерименти проведено на 50 самцях щурів масою 200–220 г, отриманих з ПП «Біомодель-сервіс». Тривалість карантину становила 14 днів, протягом яких проводили щодобовий огляд кожної тварини (поведінка та загальний стан) [9]. Перед початком дослідження тварин, що відповідали критеріям включення до експерименту, було розподілено на експериментальні групи за допомогою методу рандомізації. Дослідних тварин утримували на однаковому раціоні у звичайних умовах віварію. Їх утримання відповідало правилам Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в наукових дослідженнях (Страсбург, 1986 р.) [9].

Ішемію головного мозку моделювали шляхом двобічної оклюзії загальної сонної артерії. Операцію проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) [10]. Досліджувані препарати вводили внутрішньочеревно, одразу після виходу тварин з-під наркозу протягом 7 днів – Лізиній – у дозі 50 мг/кг [8]; пірацетам (референс-препарат) – у дозі 100 мг/кг [3].

Неврологічний статус оцінювали за шкалою Stroke-index McGrow [10] на 7 добу експерименту після курсового застосування Лізинію та референс-препарату пірацетаму.

По закінченню експерименту тварин наркотизували шляхом введення тіопенталу натрію (40 мг/кг), після чого з черепної коробки вилучали головний мозок.

У тканинах головного мозку досліджували показники енергетичного метаболізму: спектрофотометричним методом визначали вміст лактату, пірувату, креатинфосфату; та хроматографічним – аденілові нуклеотиди [10]. На підставі визначення концентрації АТФ, АДФ, АМФ обчислювали енергетичний заряд аденілової системи (ЕЗ) за формулою:

$$ЕЗ = АТФ + 1/2АДФ / АТФ + АДФ + АМФ.$$

ЕЗ є інтегративним показником та дозволяє оцінювати направленість обмінних процесів у мозковій тканині [10].

Статистичну обробку результатів проводили методами математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм «Біостатистика для Windows, версія 4.03» і «Microsoft Excel 2002». Для кожної досліджуваної ознаки визначали показники середнього арифметичного (М) і стандартної похибки середнього арифметичного (m). Нормальність розподілу перевіряли за допомогою тесту Колмогорова-Смирнова. За умови відповідності нормальності розподілу вірогідність отриманих розходжень величин, що зіставляються,

оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідність відмінностей відносних величин оцінювали із застосуванням критерію  $\chi^2$ . Статистично значущими вважали відмінності з рівнем значимості більше 95% ( $p < 0,05$ ) [11].

**Результати та їх обговорення.** Головним критерієм оцінки стійкості тканин до екстремальних впливів є стан енергетичного метаболізму, який швидко змінюється за умов ішемії [12]. Проведеними дослідженнями встановлено, що моделювання ішемії супроводжується значними порушеннями енергетичного обміну в головному мозку щурів з ішемією. Після 7 діб оклюзії загальної сонної артерії в тканинах головного мозку підвищувався вміст лактату на 84% на тлі статистично вірогідного зменшення пірувату більш ніж на 79% щодо показників інтактних тварин (табл. 1), що говорить про розвиток метаболічного ацидозу. Гіперлактацидемія свідчить про активацію процесів анаеробного гліколізу – одного з швидких механізмів адаптації до кисневого голодування. Пригнічення гліколізу ацидозом за принципом зворотного зв'язку призводить до неможливості тривалого енергозабезпечення клітини та зменшення енергосинтезуючої функції дихального ланцюга мітохондрій [5, 13, 14]. Унаслідок вищенаведених про-

Таблиця 1

*Показники енергетичного метаболізму у тканинах головного мозку щурів за моделюванням ішемії головного мозку та впливу Лізінію*

Показник	Експериментальні групи			
	Інтактні тварини	Ішемія, 7 доба (контроль)	Ішемія + Пірацетам, 100 мг/кг	Ішемія + Лізіній, 50 мг/кг
Лактат, мкмоль/г	2,110 ± 0,039	13,70 ± 0,71 <sup>#</sup>	7,58 ± 0,51 <sup>*</sup>	3,95 ± 0,39 <sup>*§</sup>
Піруват, мкмоль/г	0,73 ± 0,03	0,15 ± 0,02 <sup>#</sup>	0,38 ± 0,03 <sup>*</sup>	0,51 ± 0,02 <sup>§</sup>
Креатинфосфат, мкмоль/г	5,28 ± 0,06	1,21 ± 0,04 <sup>#</sup>	3,47 ± 0,04 <sup>*</sup>	4,15 ± 0,06 <sup>*§</sup>
АТФ, мкмоль/г	4,12 ± 0,04	1,12 ± 0,02 <sup>#</sup>	3,74 ± 0,11 <sup>*</sup>	3,90 ± 0,14 <sup>*§</sup>
АДФ, мкмоль/г	1,45 ± 0,02	0,520 ± 0,011 <sup>#</sup>	0,87 ± 0,01 <sup>*</sup>	1,12 ± 0,03 <sup>*§</sup>
АМФ, мкмоль/г	0,410 ± 0,001	0,87 ± 0,04 <sup>#</sup>	0,64 ± 0,03 <sup>*</sup>	0,58 ± 0,03 <sup>*</sup>
Енергетичний заряд аденілової системи	6,150 ± 0,001	3,340 ± 0,002 <sup>#</sup>	5,370 ± 0,001 <sup>*</sup>	5,740 ± 0,002 <sup>*§</sup>

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: <sup>#</sup> $p \leq 0,05$  відносно інтактних тварин; <sup>\*</sup> $p \leq 0,05$  відносно контролю; <sup>§</sup> $p \leq 0,05$  відносно групи пірацетаму.

**Показники неврологічного дефіциту (за шкалою McGrow) у щурів після моделювання ішемії головного мозку та курсового введення Лізинію**

Неврологічний симптом	Інтактні тварини	Ішемія, 7 доба (контроль)	Ішемія + Пірацетам, 100 мг/кг	Ішемія + Лізиній, 50 мг/кг
Сповільненість руху	4 ± 2	85 ± 5 <sup>#</sup>	25 ± 2 <sup>*</sup>	10 ± 2 <sup>*§</sup>
Манежні рухи	0	45 ± 4 <sup>#</sup>	7 ± 2 <sup>*</sup>	3 ± 1 <sup>*§</sup>
Парези 1–4 кінцівок	0	50 ± 3 <sup>#</sup>	10 ± 3 <sup>*</sup>	0
Параліч 1–4 кінцівок	0	25 ± 1 <sup>#</sup>	0 <sup>*</sup>	0

цесів відбувається зменшення рівнів макроергічних фосфатів. Встановлено, що на 7 добу ішемії в головному мозку щурів знижуються вміст креатинфосфату – на 77%; АТФ – на 65%, АДФ – у середньому на 64%, на тлі збільшення кількості АМФ – на 52% та лактату – на 85% (табл. 1). Крім того, на тлі зміни пулу аденілових нуклеотидів відбувалося зниження енергетичного заряду мітохондрій, що свідчить про розвиток енергодефіциту та зниження енергетичного потенціалу головного мозку тварин контрольної групи.

Таким чином, ішемія головного мозку у тварин контрольної групи супроводжувалася типовими метаболічними змінами гіпоксичного генезу, лактацидозом та зменшенням умісту макроергічних фосфатів у тканинах головного мозку.

Порушення енергетичного метаболізму головного мозку експериментальних тварин призводило до розвитку неврологічного дефіциту, що характеризувався тяжким та середньотяжким перебігом церебральної ішемії. Так, на 7 добу експерименту в щурів контрольної групи спостерігали сповільненість руху (85%); манежні рухи (45%); парези (50%); параліч (25%) (табл. 2). При цьому, смертність у контрольній групі тварин складала 68% (табл. 3).

Курсове призначення референт-препарату пірацетаму та Лізинію призводило до того, що в тканинах головного мозку реєстрували зниження концентрації молочної кислоти. Так, при введенні пірацетаму та Лізинію зменшення вмісту лактату складало в середньому

45% та 71% відповідно, стосовно тварин контрольної групи (табл. 1). Паралельно з цим підвищувався вміст пірувату та креатинфосфату – ключового енергетичного субстрату головного мозку. Позитивний вплив досліджуваних препаратів був встановлений й при дослідженні вмісту аденілових нуклеотидів. Курсове призначення пірацетаму та Лізинію призводило до підвищення рівня АТФ у середньому на 70% та АДФ – на 40% та 54% відповідно; та зменшення концентрації АМФ. Нормалізація під впливом досліджуваних препаратів аденілового пулу призводила до збільшення ЕЗ аденілового пулу. Найвираженіший ефект продемонстрував Лізиній, який збільшував ЕЗ у середньому на 42% щодо контролю.

Покращання енергетичного метаболізму під дією досліджуваних препаратів призводило до зменшення проявів неврологічних порушень. Так, на тлі призначення пірацетаму (100 мг/кг) та

Таблиця 3

**Вживаність тварин на 7 добу після моделювання ішемії головного мозку та курсового введення Лізинію**

Група тварин	Вживаність тварин, %
Інтактні тварини	100
Ішемія, 7 доба (контроль)	32 ± 2
Ішемія + Пірацетам, 100 мг/кг	54 ± 4 <sup>*</sup>
Ішемія + Лізиній, 50 мг/кг	67 ± 3 <sup>*#</sup>

Лізинію (50 мг/кг) у 25% та 10% щурів відповідно спостерігалася сповільненість руху, у 7% та 3% – манежні рухи; у 10% – парези кінцівок, на тлі призначення Лізинію парези кінцівок не спостерігали (табл. 2). Важливо зазначити, що на тлі введення пірацетаму на 7 добу після моделювання ішемії головного мозку виживаність тварин складала 54%; на тлі введення Лізинію – 67% (табл. 3).

Таким чином, проведеними експериментальними дослідженнями встановлено енерготропна активність Лізинію за умов гострої ішемії головного мозку. Встановлено, що курсове призначення Лізинію впливало на всі ключові інтермедіати енергообміну, а саме, зменшувалася вміст молочної кислоти, підвищувалася концентрація пірувату та креатинфосфату, нормалізувалося співвідношення АТФ/АДФ/АМФ та збільшувався енергетичний заряд мітохондрій. Енерго- та нейротропна дія Лізинію проявлялася зменшенням вираженості неврологічної симптоматики. Енерготропний механізм нейротропної дії препарату «Лізиній» пояснюється, на нашу думку, декількома обставинами. По-перше, Лізиній має виражену антиоксидантну активність, що показано в наших попередніх дослідженнях [6–8]. Антиоксидантна активність сприяє запобіганню окисної деструкції білків дихального ланцюга мітохондрій в умовах розвитку оксидативного стресу при ішемії головного мозку. По-друге, завдяки наявності в

молекулярній структурі Лізинію вільних SH-груп досліджуваний препарат здатний запобігати відкриттю мітохондріальної пори та запобігати розвитку мітохондріальної дисфункції. Крім того, завдяки SH-групам Лізиній здатний бути редокс-буфером клітини, що забезпечує відновлення SH-груп ферментів енергозабезпечення мітохондрій при їхньому окисненні [7]. У зв'язку з цим дефіцит гіолового редокс-контролю активності ферментів за умов оксидативного стресу цілком може бути компенсований завдяки стабілізуючому впливу Лізинію. По-третє, Лізиній здатен впливати на синтез цитопротективних HSP-білків, що було раніше встановлено в досліджах *in vivo* та *in vitro* [6–8]. Подібні ефекти Лізинію реалізуються, головним чином, за рахунок його антиоксидантної активності, що перешкоджає окисній модифікації HSP-білків, тим самим подовжує термін їхнього функціонування [15]. Відомо, що HSP-білки за умов дефіциту кисню виконують протективну функцію відносно індукційного фактора гіпоксії (HIF), який координує «запуск» компенсаторних реакцій організму [15, 16]. Ці обставини, на нашу думку, пояснюють й більш виражену активність Лізинію порівняно з референс-препаратом пірацетамом.

Подібна спрямованість дії Лізинію є експериментальним обґрунтуванням його застосування в клінічній практиці як ефективного нейропротектора у комплексній терапії гострого порушення мозкового кровообігу.

1. Дубенко О. Є. Причини і наслідки лакунарних інсультів головного мозку / О. Є. Дубенко, Г. Є. Костровська, С. Л. Костровський // Укр. неврологічний журнал. – 2007. – № 1. – С. 7–10.
2. Верещагин Н. В. Инсульт. Принципы диагностики, лечения и профилактики / Н. В. Верещагин, М. А. Пирадов, З. А. Суслина. – М.: Интермедика, 2002. – 208 с.
3. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М.: Медицина, 2011. – 321 с.
4. Scott V. Oxidative stress, oxidants and antioxidants / V. Scott, O. Auroma // Exp. Physiol. – 1999. – V. 8, № 6. – P. 291–295.
5. Беленічев І. Ф. Механізми формування ішемічної нейродеструкції: співвідношення оксиду азоту і тіолдисульфідної системи як фактор, що визначає тип загибелі нейрону / І. Ф. Беленічев, С. В. Павлов // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 11–16.
6. Павлов С. В. Мітопротективна дія тіольних антиоксидантів в умовах моделювання нітрозуючого стресу *in vitro* / С. В. Павлов // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2011. – № 2. – С. 95–97.
7. Беленічев І. Ф. Деякі механізми ендотеліопротективної дії нового оригінального препарату лізинію в умовах експериментального ішемічного пошкодження головного мозку / І. Ф. Беленічев, С. В. Павлов, А. В. Абрамов // Одеський медичний журнал. – 2011. – Т. 2 (124). – С. 21–24.
8. Ефекти нового ендотеліопротектора «Лізиній» на систему глутатіону та NO-синтазну активність у головному мозку за умов гострої церебральної ішемії / І. Ф. Беленічев, С. В. Павлов, І. А. Мазур, Л. І. Кучеренко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – № 3 (22). – С. 40–46.
9. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О. В. Стефанов. – К.: «Авіцена», 2002. – 527 с.

10. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев.– К.: ДФЦ МОЗ України, 2010.– 81 с.
11. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич.– К.: МОРИОН, 2002.– 640 с.
12. Coca A. Cerebral involvement in hypertensive cardiovascular disease / A. Coca // Eur. Heart J.– 2003.– № 5.– Р. 19–25.
13. Ливанов Г. А. Нарушение транспорта кислорода при острых отравлениях нейротропными препаратами и его метаболическая коррекция / Г. А. Ливанов, Б. В. Батоцыренов, С. И. Глушков // Междунар. неврол. журн.– 2002.– Т. 1.– С. 33–36.
14. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов.– Донецк: Издательский дом Заславский, 2009.– 348 с.
15. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury / J. C. Plumier, A. M. Krueger, R. W. Currie, D. Kontoyiannis // Cell Stress Chaperones.– 1997.– № 2.– Р. 162–167.
16. Беленичев І. Ф. Нейропротективний профіль селективних модуляторів естрогенових рецепторів на моделі гострого порушення мозкового кровообігу / І. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // Фармакологія та лікарська токсикологія.– 2011.– № 6.– С. 10–15.

**И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур**  
**Энерготропный механизм церебропротекторного действия нового оригинального препарата «Лизиний» в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения**

Экспериментальными исследованиями установлены энерготропные механизмы церебропротективного действия нового оригинального препарата «Лизиний» в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения, проявляющегося по типу ишемического инсульта. Курсовое назначение Лизиния (50 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней) животным с ишемией головного мозга приводило к усилению аэробной продукции АТФ, нормализации функционирования цикла Кребса, снижению метаболического ацидоза. Позитивное действия Лизиния на энергетический метаболизм проявлялось уменьшением неврологического дефицита (шкала McGrow) на 4 сутки эксперимента. По силе церебропротекторного действия Лизиний статистически достоверно превосходил референс-препарат пирацетам.

*Ключевые слова:* церебральная ишемия, энергетический метаболизм, Лизиний

**I. Belenichev, S. Pavlov, L. Kucherenko, I. Masur**  
**Energotropic mechanism of the cerebroprotective action of the new original medication «Lisinyi» on the model of the acute cerebral circulation insufficiency**

Cerebral ischemia and chronic forms of the vascular insufficiency till this time remain one of the actual problems in the neurology. Epidemiological data shows that cerebral ischemia morbidity is 150 cases per 100 hundred persons per year. This makes big value of the ways of the effective protection against hypoxia. There was new medical compound with original structure – L-lisinyi 1,2,4-triazolol-5-thyoacetate with primary name Lisinyi created at the pharmaceutical chemistry department of the Zaporizhia state medical university. Lisinyi includes fragments of the tyotriazoline and L-Lisinyi escinate. The aim of the study was to assess the influence of the Lisinyi on the energetic chains of the neurodestruction in the conditions of the acute cerebral ischemia modelling. Cerebral ischemia was modelled in the way of the double occlusion of the carotids. Parameters of the energetic metabolism were studied in the brain. Lactate, pyruvate, phosphocreatine levels were determined with spectrophotometry, adenylic nucleotids – with chromatography. Energetic charge was estimated using the level of the ATP, ADP, AMP. Experimental study showed energotropic activity of the Lisinyi following the acute cerebral ischemia. It was founded that the Lisinyi administration influenced on all key mediators of the energetic metabolism, decreased level of the lactate acid, increased level of the pyruvate and phosphocreatine, normalised ATP/ADP/AMP ratio. Treatment with Lisinyi increased energetic charge of the mitochondria. Energo- and neutotropic action of the Lisinyi manifested in the neurologic symptoms decrease. Energotropic action of the Lisinyi was explained in several ways. On the one hand Lisinyi has antioxidant activity as it has been showed in our previous studies. This activity allows Lisinyi to prevent oxide destruction of the proteins of the mitochondrion respiration chain in the condition of the oxidative stress in cerebral ischemia. On the other hand, free SH-groups in the Lisinyi structure allow to predict opening of the mitochondrial pore and to prevent mitochondrial dysfunction. These facts show Lisinyi potency as effective neuroprotector in complex therapy of the cerebral ischemia.

*Key words:* cerebral ischemia, energetic metabolism, Lisinyi

Надійшла: 14.05.2013 р.

**Контактна особа:** Павлов Сергій Васильович, Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: +38 0 97 797 08 84.  
 Електронна пошта: zsmu.smu@yandex.ua.