



І.Ф. Бєленічев, Д.М. Юрченко, К.В. Александрова, О.С. Шкода, Н.В. Бухтіярова

ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНОЇ ДІЇ ПОХІДНОГО 3-МЕТИЛКСАНТИНУ – СПОЛУКИ С-4 – В УМОВАХ ДВОСТОРОННЬОЇ ПЕРЕВ'ЯЗКИ ЗАГАЛЬНИХ СОННИХ АРТЕРІЙ (ІШЕМІЧНИЙ ІНСУЛЬТ)

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: ксантини, антиоксидантна активність, церебропротективна дія, ішемічний інсульт.

Ключевые слова: ксантины, антиоксидантная активность, церебропротективное действие, ишемический инсульт.

Key words: xanthines, antioxidant activity, cerebroprotective action, ischemic stroke.

Показано необхідність створення біологічно активних речовин для лікування судинних захворювань. Здійснено *in vivo* дослідження церебропротективної дії сполуки С-4 з класу ксантинів на моделі неповної глобальної ішемії головного мозку. Вивчено стан антиоксидантної системи та енергетичного обміну.

Показана необхідність створення біологічно активних речовин для лікування судинних захворювань. Проведено *in vivo* дослідження церебропротективного действия соединения С-4 из класса ксантинов на модели неполной глобальной ишемии. Изучено состояние антиоксидантной системы и энергетического обмена.

The article shows the need for biologically active substances for the treatment of vascular diseases. Cerebroprotective action of compound С-4 of xanthine class on the model of incomplete global ischemia and the state of antioxidant system and energy metabolism were studied *in vivo*.

В останні роки відзначено зростання поширеності судинних захворювань, у тому числі гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК). Ішемічне пошкодження головного мозку супроводжується тяжкими неврологічними розладами, такими як порушення когнітивних, моторних, вербальних та інших функцій ЦНС [1]. Згідно до міжнародних епідеміологічних досліджень (World Development Report), у світі від інсультів щороку помирають 4,7 млн осіб. У більшості країн інсульт посідає 2–3 місце в структурі загальної смертності населення, в нашій країні – друге, поступаючись лише кардіоваскулярній патології. Серед усіх видів інсультів переважає ішемічне пошкодження мозку [1].

Тому пошук способів фармакологічної корекції цих порушень, а також препаратів, що знижують ступінь нейродегенерації при ішемії мозку, є актуальною задачею сучасної фармацевтичної науки.

Нині здійснюється активний пошук нових церебропротекторів серед сполук, що впливають на компенсаторні шунти синтезу АТФ в умовах ішемії мозку, що модулюють глутамат- та ГАМК-ергічну системи, регулюють активність Са-каналів і систему оксиду азоту, а також серед антиоксидантів, нейропептидів, інгібіторів експресії прозапальних цитокінів й антагоністів ІЛ-1β-рецепторів [1–3].

Тісний взаємозв'язок порушень енергетичного та пластичного обмінів, їх вплив на перебіг і прогноз захворювання нерідко не враховують при розробці схем лікування, а основною патогенетичною терапією вважається відновлення гемодинаміки. Останнім часом порушенням енергетичного метаболізму та можливостям його корекції приділяється велика увага. Багато вчених вважають, що метаболічна терапія, що здійснюється як у гострий період інсульту, так і у відновний, є потужним превентивним

фактором відносно до повторних інсультів, інвалідації хворих та їх загибелі [4,5]. Отже, доцільне включення в комплексну терапію мозкових інсультів препаратів, що характеризуються енерготропною, антиоксидантною, протиішемічною, ноотропною діями.

Раніше повідомляли про синтез сполуки С-4 – (8-N-бензиламінотеофілініл-7)ацетатної кислоти (1-фенілетиліден)гідразида, що проявляє високі антиоксидантні властивості *in vitro* [6].

МЕТА РОБОТИ

Вивчення *in vivo* нейропротективної дії сполуки С-4 в умовах двосторонньої перев'язки загальних сонних артерій (ішемічний інсульт) та в порівнянні з фармакологічним стандартом нейропротектором-антиоксидантом мексидолом.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальну частину виконано на білих щурах лінії Вістар обох статей, масою 220–260 г. Усіх тварин утримували на стандартному раціоні харчування віварію, за природної зміни дня і ночі. Щурів отримано з розплідника ІФТ України. Всі експериментальні процедури та оперативні втручання здійснювали у відповідності з «Положенням про використання лабораторних тварин у біомедичних дослідженнях». Для оцінки нейропротективної дії досліджуваної сполуки використано модель неповної глобальної ішемії головного мозку, що найбільш адекватна клінічними проявами ішемічного інсульту [2,7]. Цю модель відтворювали шляхом двобічної перев'язки загальних сонних артерій.

Двобічну перев'язку загальних сонних артерій виконували під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) з використанням хірургічного доступу шляхом виділення сонних артерій та одномоментного накладання на них шовкової лігатури [2,7]. Досліджувану сполуку С-4 вводили раз на добу протягом



Вплив С-4 на виживання та розвиток неврологічного дефіциту у тварин у різні терміни після ГПМК

Група тварин	Кількість щурів з важкою симптоматикою, %	Середній бал за шкалою С.Р. McGrow	Співвідношення прооперованих щурів і тварин, що вижили на 4 добу, %
	На 4 добу	На 4 добу	
Інтактні щури	0	2,00±0,60	(5/5) 100
Щури з ГПМК	100	19,7±5,87	(15/5) 33
Щури з ГПМК + С-4	80	12,7±3,11*	(15/12) 80*§
Щури з ГПМК + мексидол	87,5	16,3±4,3*	(15/8) 53*

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно до контролю; § – $p < 0,05$ відносно до групи тварин, що отримували мексидол.

всього експерименту в дозі 100 мг/кг внутрішньошлунково за допомогою металевого зонду, мексидол – за тією ж схемою в дозі 250 мг/кг внутрішньошлунково. Інтактом виступали псевдооперовані тварини, яким під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) з використанням хірургічного доступу, виділяли сонні артерії, проте не накладали лігатуру.

Для оцінки тяжкості ішемічного пошкодження тканин мозку та ефективності фармакокорекції проводили біохімічні дослідження артеріальної крові. З метою вивчення віддалених результатів фармакокорекції, у експериментальних тварин на 4 добу після операції забирали головний мозок. Для біохімічних досліджень використовували лобні долі кори. Для біохімічних досліджень тканини мозку гомогенізували на холоді в сольовому ізотонічному середовищі (0,15 М КСІ) за температури +4°C за допомогою скляного гомогенізатора, у співвідношенні тканина – сольовий розчин 1:10. Після цього методом диференційного центрифугування виділяли цитозольну фракцію (15000 g). Екстракт, позбавлений білків, отримували додаванням точної наважки гомогенату тканини мозку в 0,6 М розчині НСІО₄ з наступною нейтралізацією 5,0 М розчином калій карбонату [8].

Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (ГПР), показниками окислювальної модифікації білка в тканинах головного мозку.

Стан енергетичного обміну визначали за рівнем найбільш значущих інтермедіатів: АТФ, АДФ, АМФ, лактату, пірувату та малату. Про ішемічне пошкодження тканин головного мозку судили за гіперферментацією ВВ-КФК.

Визначення активності СОД проводили за методикою, описаною Чеварі та співавторами [9]. Активність СОД виражали в у.од./мг білка/хв.

Активність каталази визначали спектрофотометрично [10]. Активність каталази виражали в мкат/мг білка/хв.

Активність ГПР визначали за методикою [11]. Активність ГПР виражали в мкмоль ГSH/мг білка/хв.

Показники окислювальної модифікації білка в тканинах головного мозку визначали за методом В. Halliwell [12,13]. Для альдегідфенілгідразонів (АФГ) спектр поглинання зареєстровано при довжині хвилі 274 нм, а для карбоксилфенілгідразонів (КФГ) – при 363 нм.

Активність ВВ-КФК визначали після розділення, на сефадексі ДЕАЕ-А-50 (DEAE Sephadex A-50) за оптичним тестом Варбурга [7]. Активність ВВ-КФК виражали в мкм/л/год.

Кількість малату визначали за методом Хохорста [8]. Утворення відновленої форми НАДН еквівалентне кількості окисленого малату, наростання якого реєструють при 340 нм.

Аденілові нуклеотиди визначали методом тонкошарової хроматографії [8].

Вміст пірувату визначали за методом Цоха-Ломпрехта [8]. Кількість використаного в реакції пірувату еквівалентна кількості НАДН, зниження якого визначається при 340 нм.

Вміст лактату визначали за методом Хохорста [8]. Утворення відновленої форми НАД еквівалентне кількості окисленого лактату, збільшення кількості якого реєструють при 340 нм.

Неврологічний дефіцит визначали за шкалою srtoke – index С.Р. McGrow [2,14].

Статистичну обробку [15] даних проводили з використанням стандартного пакету програм Microsoft Office Excel 2003, а також програми статистичної обробки результатів «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc. AXXR712D833214-FAN5). Дані наведено у вигляді вибіркового середнього значення ± стандартна помилка середнього значення. Перевірку на нормальність розподілу здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Достовірність різниць між експериментальними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента та U-критерію Уїтні-Мана.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Двобічна перев'язка загальних сонних артерій викликала тяжкі неврологічні зміни у тварин: паралічі, парези, птоз із максимальним проявом на 4 добу. Так, на цей період у групі тварин, яких не лікували, середній бал за шкалою С.Р. McGrow складав 19,7 бали, що відповідає тяжкому ступеню неврологічної симптоматики (табл. 1).

На 4 добу у контрольній групі вижили 33% тварин. Введення шурам з ГПМК досліджуваної сполуки С-4 мало виражений церебропротективний ефект. Так, на 4 добу експерименту середній бал у цій групі склав 14,5, а летальність зменшилась на 34% у порівнянні з контролем. Однак 80% тварин проявляли тяжкий неврологічний дефіцит. Мексидол за силою нейропротективної дії поступався С-4.

Біохімічні дослідження показали, що двобічна перев'язка загальних сонних артерій призводить до типових ішемічних порушень: дефіциту макроергічних фосфатів, дискоординації в циклі Кребса, активації анаеробного гліколізу та розвитку оксидативного стресу.

Введення сполуки С-4 також призводило до збільшення синтезу АТФ, за рахунок активації аеробного шляху окис-

Вплив С-4 на вміст аденілових нуклеотидів у головному мозку та активність ВВ-КФК у сироватці крові тварин на 4 добу після ГПМК

Група тварин	АТФ, мкмоль/г тканини	АДФ, мкмоль/г тканини	АМФ, мкмоль/г тканини	ВВ-КФК, ммоль/л/год
Інтактні тварини	2,01±0,12	0,53±0,005	0,12±0,003	0,04±0,003
Тварини з ГПМК	1,07±0,07	0,24±0,003	0,27±0,002	0,17±0,005
Тварини з ГПМК + С-4	1,62±0,07*	0,47±0,004*	0,11±0,004*	0,070±0,002*§
Тварини з ГПМК + мексидол	1,33±0,12*	0,44±0,005*	0,15±0,011*	0,093±0,005*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно до контролю; § – $p \leq 0,05$ відносно до групи тварин, що отримували мексидол.

Вплив сполуки С-4 на показники енергетичного обміну в головному мозку на 4 добу після ГПМК

Група тварин	Піруват, мкмоль/г тканини	Лактат, мкмоль/г тканини	Малат, мкмоль/г тканини
Інтактні тварини	0,51±0,06	2,7±0,02	0,26±0,03
Тварини з ГПМК	0,22±0,02	9,2±0,07	0,11±0,01
Тварини з ГПМК + С-4	0,45±0,03*	3,8±0,04*	0,24±0,02*
Тварини з ГПМК + мексидол	0,37±0,04*	4,9±0,03*	0,26±0,02*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно до контролю; § – $p \leq 0,05$ відносно до групи тварин, що отримували мексидол.

лення (табл. 2), на що вказує достовірне підвищення рівня малату, зниження вмісту лактату, яке свідчило про зменшення лактат-ацидозу в нервовій тканині та підвищення рівня пірувату в порівнянні з контролем.

Слід зазначити, що С-4 призводив до підвищення рівня АТФ на фоні зниження АМФ, який є прооксидантом та індуктором агрегації тромбоцитів. Вочевидь, сполука С-4 позитивно впливає на метаболізм аденілових нуклеотидів, посилюючи інтенсивність утилізації АМФ, гальмуючи тим самим запуск ксантинооксидазної реакції утворення АФК. У дії мексидолу відзначено схожий за направленістю, проте менш виражений ефект відносно до показників біоенергетики (табл. 3).

Важливим механізмом нейропротективної дії сполуки С-4 стала її антиоксидантна дія, вперше виявлена та описана в досліджах *in vitro*. Так, найважливішою ланкою антиоксидантної дії С-4 в умовах ГПМК є захист білкових молекул нейрокитів в умовах ішемії. Відомо, що однією з ланок патогенезу церебральної ішемії є продукція активних форм кисню (АФК) біоенергетичними та нейрохімічними системами головного мозку [16]. Надлишок АФК в умовах антиоксидантної недостатності призводить до окислювальної модифікації ліпідів, білків, нуклеїнових кислот. Окислювальна модифікація білкових фрагментів рецепторів, іонних каналів, синаптичних структур нейрону призводить до порушення генерації, утворення, провідності нервового імпульсу, порушує синаптичну передачу і, як наслідок, призводить до погіршення когнітивно-мнестичних функцій головного мозку [11,16]. Відомо також, що під впливом АФК у клітині відбувається активація експресії редокс-чутливих генів, одні з яких необхідні для захисту клітин від токсичних ефектів окислювального стресу, а інші – при надлишку АФК ініціюють апоптичну загибель нейрональної клітини [12,16]. Нині окислювальний стрес і його ланка, окислювальна модифікація білків, вважається

одним із важливих механізмів нейродеструкції. В умовах моделювання ГПМК виявлено підвищення альдегідних (АФГ) і карбоксильних (КФГ) продуктів ОМБ у тканинах головного мозку щурів на 4 добу (табл. 4 та 5).

Вплив С-4 на окислювальну модифікацію білка в головному мозку тварин на 4 добу після ГПМК

Група тварин	Продукти ОМБ, у.од./г білка	
	АФГ (270 нм)	КФГ (363 нм)
Інтактні тварини	5,7±0,42	7,2±0,37
Тварини з ГПМК	17,5±1,12	28,6±1,76
Тварини з ГПМК +С-4	6,7±0,55*§	11,7±0,75*§
Тварини з ГПМК + мексидол	11,1±1,11*	17,1±1,40*

Примітка: * – $p \leq 0,05$ відносно до контролю; § – $p \leq 0,05$ відносно до групи тварин, що отримували мексидол.

Введення мексидолу призводило до достовірного зменшення нейротоксичних продуктів ОМБ – АФГ та КФГ. Сполука С-4 проявляла потужну антиоксидантну дію в гострий період ішемії мозку, гальмуючи окислювальну модифікацію білка, про що свідчив достовірно низький рівень АФГ та КФГ у тканинах головного мозку щурів, що приймали курсом С-4 у порівнянні з групою тварин, яких не лікували. В мозку тварин, яких лікували С-4, спостерігали підвищення активності ключових антиоксидантних ферментів – СОД, каталази та ГПР, що регулюють основні ешелони антиоксидантного захисту нейрону. Очевидно, що досліджувана сполука С-4 знижувала ступінь окислювального пошкодження не тільки білкової частини антиоксидантних ферментів, але й небілкового активного центру, що доведено в досліджах *in vitro* на прикладі СОД.

Подібна антиоксидантна дія сполуки С-4 дуже важлива та є вирішальною у визначенні сумарного механізму її нейропротективного ефекту. Тобто механізм нейропротективної дії С-4 є характерним для вторинних нейропротекторів



Вплив С-4 на активність антиоксидантних ферментів у головному мозку на 4 добу після ГПМК

Група тварин	СОД, у.од./мг білка/хв	Каталаза, мкат/мг білка/хв	ГПР, мкмоль/мг білка/хв
Інтактні тварини	277,2±18,1	15,5±1,35	68,3±3,5
Тварини з ГПМК	112,7±7,5	8,7±0,5	41,2±3,4
Тварини з ГПМК + С-4	267,8±10,5*§	12,0±0,56*§	60,6±4,3*
Тварини з ГПМК + мексидол	198,5±8,1*	11,7±0,75*	47,5±7,7

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно до контролю; § – $p < 0,05$ відносно до групи тварин, що отримували мексидол.

з антиоксидантним механізмом (емоксипіну, мексидолу, тіоцетаму, яктону, цитофлавіну, реамберину), що позитивно зарекомендували себе в неврологічній практиці [16].

Слід також зазначити, що в результаті гальмування окислювальної модифікації білків нервової тканини та підвищення її резистентності до ішемії на фоні застосування С-4 відбувалась також стабілізація мембран нейронів, про що свідчить достовірне зниження гіперферментемії ВВ-КФК як відносно до групи тварин, яких не лікували, так і до групи тварин, що отримували курсом мексидол.

ВИСНОВКИ

Експериментальними дослідженнями показано значні церебропротективні властивості сполуки С-4 в умовах експериментального ГПМК.

Курсове призначення тваринам з ГПМК сполуки С-4 внутрішньошлунково в дозі 100 мг/кг/добу протягом 4 діб достовірно зменшувало летальність, кількість тварин з важкою неврологічною симптоматикою (зниження за шкалою С.Р. McGrow).

Провідними ланками механізму церебропротективної дії сполуки С-4 є антиоксидантна активність (гальмування окислювальної модифікації білків нервової тканини) та протиішемічна активність (інтенсифікація аеробних реакцій утворення АТФ).

За силою нейропротективної дії сполука С-4 перевершує референт-препарат нейропротектор-антиоксидант мексидол.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М.: Медицина, 2001. – 328 с.
2. Поварова О.В. Влияние фенил-т-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 // Экспер. и клин. фармакол. – 2004. – Т. 67, №1. – С. 3–6.
3. Chiueh C. The neurobiology of NO and OH / C. Chiueh – N.Y.: Acad. Sci., 1994. – 265 p.
4. Церебропротективные эффекты антиоксидантов при нейродеструктивных нарушениях, обусловленных токсических действием кислородных радикалов / В.В. Дунаев, Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев [и др.] // Современные проблемы токсикологии. – 2004. – №1. – С. 7–14.
5. Scott B. Oxidative stress, oxidants and antioxidants / B. Scott, O. Auroma // Exp. Physiol. – 1999. – Vol. 8, №6. – P. 291–295.
6. Висновок про видачу патенту на корисну модель «(8-N-бензиламіногеофілініл-7)ацетатної кислоти (1-фенілетиліден)гідрозид, який виявляє антиоксидантну дію», від 03.05.2012 р., заявка № У 2011 14381, дата подання 05.12.2011 р. / Д.М. Юрченко, І.Ф. Беленічев, К.В. Александрова, М.І. Романенко, Н.В. Бухтіярова.
7. Медикаментозная защита головного мозга при моделировании ишемии и реперфузии / В.Н. Клименко, И.Ф. Беленичев, И.Н. Башкин [и др.] // Клинич. хирургия. – 1993. – №12. – С. 50–52.
8. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен); под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.
9. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и методы ее определения в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Сеней // Лаб. дело. – 1988. – №11. – С. 678–681.
10. Королюк М.А. Способ определения активности каталазы / М.А. Королюк // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.
11. Беленичев И.Ф. Изменение активности глутатионпероксидазы у больных с окклюзионными поражениями сосудов зрительного нерва / И.Ф. Беленичев, С.Ф. Максименко // Офтальмолог. журн. – 1996. – №3. – С. 150–153.
12. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M. Gutteridge. – Oxford: Clarendon Press, 1985. – 346 p.
13. Halliwell B. Molecular Biology of free Radicals in Human Diseases / B. Halliwell. – London: St. Lucia: OICA, 1999. – 410 p.
14. McGrow C.P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / C.P. McGrow // Arch. Neurol. – 1977. – Vol. 34, №6. – P. 334–336.
15. Зайцев В.М. Прикладная медицинская статистика: Учебное пособие / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И. Маринкин. – 2-е изд. – СПб.: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2006. – 432 с.
16. Беленичев И.Ф. Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленичев, Ю.М. Колесник, В.И. Черный. – Донецк, 2008. – 264 с.

Відомості про авторів:

Беленічев І.Ф., д. біол. н., професор, зав. каф. фармакології та медичної рецептури ЗДМУ.

Юрченко Д.М., аспірант каф. біологічної хімії та лабораторної діагностики ЗДМУ.

Александрова К.В., д. хім. н., професор, зав. каф. біологічної хімії та лабораторної діагностики ЗДМУ.

Шкода О.С., к. фарм. н., ст. викл. каф. органічної та біоорганічної хімії ЗДМУ.

Бухтіярова Н.В., к. мед. н., доцент каф. фармакології та медичної рецептури ЗДМУ.

Поступила в редакцію 18.06.2012 г.