

Е. В. Супрун¹, І. В. Кабачна¹, В. І. Кабачний¹,
А. В. Абрамов², Н. В. Бухтіярова²

Модуляція процесів нейроапоптозу в щурів після кетамінового та пропофолового наркозів під впливом Гетерозиду

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: Кетамін, Пропофол, нейропротекція, апоптоз, *c-fos*-позитивні клітини, *bcl-2*-білок

Мільйони пацієнтів щорічно звертаються до хірургів і піддаються впливу загальних анестетиків (ЗА) під час проведення діагностичних процедур і хірургічних втручань. Раніше вважалося, що ефекти анестезії швидко виникають і так само швидко зникають, тому після видалення анестетиків з організму головний мозок повертається до передопераційного стану й пацієнт пробуджується, отже негативні ефекти ЗА на центральну нервову систему (ЦНС) у віддаленому постнаркозному періоді відсутні. Однак останніми роками з накопиченням даних епідеміологічних й експериментальних досліджень з впливу ЗА на головний мозок стало очевидним, що центральні анестетики крім основної анальгезуючої та гіпногенної дії викликають перманентні ішемічно/гіпоксичні нейрональні та неврологічні зміни, низку побічних нейротоксичних ефектів шляхом запуску запрограмованої загибелі нейронів – апоптозу [1]. Показано, що на частоту та тяжкість побічної дії наркозу на ЦНС впливають доза анестетиків і тривалість загальної анестезії [2, 3]. Ранньою маніфестацією нейронального ушкодження, зумовленого ЗА, є порушення вищих коркових функцій, у першу чергу, пам'яті та когнітивних процесів, розвиток післяопераційної когнітивної дисфункції (ПОКД, *postoperative cognitive dysfunction*) [4]. Найуразливішими до дії ЗА є функція уваги, короткострокова пам'ять, швидкість психомоторних і когнітивних реакцій. Разом з тим у

літературі лише деякі роботи присвячені застосуванню нейропротективних препаратів для профілактики та лікування нейрокогнітивних розладів у післяопераційному періоді [5, 6].

Профілактична нейропротективна терапія, поряд з вибором адекватного варіанту анестезії, своєчасною корекцією порушень гемодинаміки, газообміну та гомеостазу, набуває найважливішого значення для запобігання ушкоджень нейронів або усунення когнітивної дисфункції, яка вже виникла в ранньому післяопераційному періоді, коли ці зміни ще є потенційно зворотними [7]. Впливаючи на церебральний метаболізм, вона попереджає або перериває патологічні каскади, що викликають дисфункцію або загибель нейронів. Для отримання максимального протективного ефекту щодо ішемічно/гіпоксичних ушкоджень тканин головного мозку, у тому числі під час ЗА, необхідно домогтися переривання патогенетичного постгіпоксичного каскаду на більш ранніх етапах, у тому числі на етапі активації некрозо/апоптотичних процесів у зонах ішемічно/гіпоксичних пошкоджень тканин [8].

З метою поліпшення анестезіологічної безпеки під час оперативних втручань перспективним напрямом також може бути розширення асортименту засобів первинної та вторинної нейропротекції шляхом цілеспрямованого синтезу потенційних нейропротекторів з аналептичною дією, що діють на ті самі структури, які остаточно пригнічені самим центральним анестетиком або його активними метаболітами [5]. У зв'язку з цим обґрунтованим і перспективним є пошук серед похідних сірко- та

нітрогеновмісних гетероциклів (гетерозидів) універсальних, нешкідливих нейропротекторів з аналептичною дією, які здатні швидко й ефективно прискорювати реанімацію життєвоважливих функцій організму, загальну детоксикацію, переривати наркоз, вирішувати одразу широкий спектр медико-соціальних проблем невідкладних станів [9].

Обґрунтованим може стати застосування нейротрофічного церебропротектора Цереброкуруину (нейропептидвміщуючий препарат нового покоління, отриманий з ембріонів великої рогатої худоби) [10]. Також як перспективний ноотроп для корекції післяопераційної когнітивно-мнестичної дисфункції можна розглядати Ноопепт, нейропротекторна дія якого має комплексний механізм, здатний протидіяти глутаматній ексайтотоксичності за ішемії головного мозку, тривалих впливах стресових факторів, розумовому й емоційному перенапруженню, інтоксикаціях [10].

Мета дослідження – порівняти нейропротективну активність Гетерозиду і референтс-препаратів Цереброкуруину та Ноопепту за умов експериментального наркозу Кетаміном і Прополофом за впливом на вміст у тканинах головного мозку щурів проапоптотичного білка c-Fos й антиапоптотичного bcl-2-білка.

Матеріали та методи. У досліджах використовували білих безпородних щурів масою 180–200 г, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин становила 14 днів. Усі експериментальні процедури здійснювали відповідно до «Положення про використання тварин в біомедичних дослідженнях» та Європейської конвенції «Про захист тварин, що використовуються для наукових та інших цілей». Тварин утримували на стандартному раціоні віварію за природної зміни дня та ночі. Доступ тварин до води був вільним. Усі маніпуляції, які можуть завдати болю, проведені під етамінал-натрієвим наркозом. Комітетом з біоетики НФаУ (протокол від 17 травня 2017 р. № 5/1) встановлено, що проведені дослідження не суперечать загальноприйнятим біо-

етичним нормам з дотримання відповідних міжнародних рекомендацій стосовно проведення експериментальних досліджень.

Оригінальне похідне сірко- та нітрогеновмісних гетероциклів Гетерозид (2 R, 5-(1,3-тіазоліл) амід етилендикарбонової кислоти натрієва сіль) було синтезовано на кафедрі фізичної та колоїдної хімії Національного фармацевтичного університету (лабораторний зразок), визначено ED₅₀ за аналептичною активністю на рівні 2 мг/кг і LD₅₀ експрес-методом Т. В. Пастушенко – 1350 мг/кг, що за класифікацією Hodge та Sterner дозволило віднести її до IV класу малотоксичних речовин [11].

Дослідження проведено на 90 білих безпородних щурах віком 6 міс., масою 220–290 г. Кетамінову та прополофову анестезію проводили шляхом уведення 100 мг/кг відповідно Кетаміну/Прополофу внутрішньоочеревинно (в/о). Після виходу тварин з наркозу їм одноразово вводили: Гетерозид – в/о 2 мг/кг, Цереброкуруин (ТОВ «НІР», Україна) – в/о 0,2 мг/кг, Ноопепт (ЗАТ «Мастерклон», вироблено ВАТ «Щолківський вітамінний завод») – інтраназально 10 мкг/кг. Тварини були розподілені на 9 груп по десять тварин у кожній. Перша група – інтактні тварини (контроль), друга та третя – тварини з експериментальним наркозом Кетаміном/Прополофом (контрольна патологія – КП), четверта та п'ята – тварини з наркозом, яким вводили Гетерозид (група КП + Гетерозид); з шостої по дев'яту – тварини з наркозом, яким вводили Цереброкуруин (група КП + Цереброкуруин) або Ноопепт (група КП + Ноопепт). Інтактна група отримувала одноразово в/о фізіологічний розчин, 1 мл на 100 г ваги, а контрольна група після введення Кетаміну/Прополофу одноразово – в/о фізіологічний розчин в аналогічному дозуванні. Тварин виводили з експерименту через 48 год після проведення наркозу.

Для проведення гістоімунохімічних досліджень головний мозок тварин розміщали у фіксаторі Буена (18 год), і після стандартної гістологічної проводки тканину укладали в парапласт. На ротаційному мікромомі виготовлялися

15-мікронні зрізи гіпокампа, які депарафінували за стандартною методикою. Для виявлення експресії c-fos в CA1 зоні гіпокампа використовували імуногістохімічний метод непрямой імунофлюоресценції. Спершу на зрізи наносили первинні антитіла до білка c-fos (Sigma Chemical, USA), інкубували за + 400 °C 24 год і після інкубації зрізи тричі промивали 0,1 моль/л фосфатним буфером pH 7,4. Потім на зразки наносили вторинні антитіла (флюоресцент кон'югований козячий IgG) (Sigma Chemical, USA), інкубували за кімнатної температури 60 хв і після інкубації зрізи промивали 0,1 моль/л фосфатним буфером. Fos-імунопозитивні нейрони CA1 зони гіпокампа досліджували на флюоресцентному мікроскопі Axioskop (Zeiss, Germany) – зображення, одержані на мікроскопі, за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4922 (COCHU Inc., США) вводили в комп'ютерну програмно-апаратну систему цифрового аналізу зображення VIDAS.

Концентрацію bcl-2 у цитоплазматичній фракції головного мозку визначали методом Вестерн-блот аналізу. Білки розділяли в 10 % поліакриламідному гелі. Поділ білкових фракцій проводили шляхом електрофорезу – для ущільнення гелю за напруги 100 V, коли проби досягали межі розділу гелів за напруги 200 V і до того часу, доки проби не досягнуть закінчення гелю. Білки з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану за напруги 100 V і сили струму 0,35 A протягом 1 год. Після перенесення мембрану поміщали в блокуючий буфер, що містив 1 % розчин бичачого сироваткового альбуміну (Sigma, USA, кат. № A2153) на 20 год. Відмиту на шейкері протягом 5 хв у розчині 0,1 моль/л фосфатного буферу pH 7,4 мембрану поміщали в розчин первинних антитіл проти bcl-2 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology), інкубували 2 год за кімнатної температури та відмивали на шейкері 4 рази по 5 хв у 0,1 моль/л фосфатному буфері. Після цього мембрану поміщали в розчин вторинних антитіл (1:1000) (біотинильований анти-мишачий IgG, Sigma, USA, кат. № 051M4885), інкубували 2 год і відмивали на шейкері

4 рази по 5 хв у розчині 0,1 моль/л фосфатного буфера. Поміщали мембрану в розчин ExtrAvidin-пероксидази (Sigma, USA, кат. № 051M4885) у 1 % розчині бичачого сироваткового альбуміну (1:1000), інкубували 1 год і промивали. Для візуалізації мембрану обробляли розчином АЕК: 1 таблетка 3-аміно-9-етилкарбазолу (Sigma, USA, кат. № a6926), розчинена в 2,5 мл ДМФА, що містить 47,5 мл 0,05 моль/л ацетатного буфера, pH 5,0, 25мкл 30 % H₂O₂. Мембрану інкубували в субстратній суміші 5–10 хв. Червоний нерозчинний преципітат характеризує комплекс антиген-антитіло в блоті. Мембрану промивали в дистильованій воді кілька разів. Висушували смужки між листами фільтрувального паперу під потоком холодного повітря. Детекцію bcl-2 здійснювали за допомогою денситометрії за програмою Adobe Photoshop.

Результати дослідження розраховували зі застосуванням стандартного статистичного пакета ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., № AXXR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Shapiro-Wilk. Дані представлені у вигляді середнього значення. Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента у разі нормального розподілу. У разі розподілу, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних використовували критерій U Mann-Whitney. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) за нормального розподілу або критерій Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності в разі $p < 0,05$ (95 %).

Результати та їх обговорення. Натепер є загально визнаним, що ключовий фактор патогенезу захворювань нервової системи – загибель нейрона – може бути двох видів: програмована клітинна смерть (апоптоз) і патологічна клітинна смерть (некроз). Механізми загибелі нервової клітини за нейродегенеративних захворювань реалізуються

переважно за механізмом апоптозу, а в разі гострих захворювань і ушкоджень нервової системи – в основному за шляхом некрозу. Апоптоз як програмований процес клітинної загибелі знищує приблизно половину всіх нейронів, що утворилися в період нейрогенезу, зберігаючи нейрони, що мають важливі функціональні зв'язки з іншими нейронами. Основний процес нейронального некрозу має місце в період загибелі клітин навіть протягом кількох наступних днів після ішемічного ушкодження. Отже, корекція активності процесу апоптозу має розглядатися як нейропротекторна стратегія.

Результати дослідження підтверджують активацію процесів апоптозу в тканині мозку в умовах експериментальної анестезії (табл. 1).

У СА1 зоні гіпокампа мозку щурів контрольної групи на моделі кетамінового наркозу відзначено зростання експресії c-fos (c-fos-позитивних клітин) практично в 10 разів ($p < 0,01$), що відображає прогресуючу активацію апоптотичних процесів у ранньому постнаркозному періоді. У головному мозку щурів групи Кетамін + Гетерозид відзначено зниженням вмісту c-fos-позитивних клітин уже в гострому постішемічному періоді на 38 % відносно контрольної групи ($p < 0,05$), що відображає стабілізацію апоптотичних процесів. За кетамінового наркозу та введення експериментальним щурам Цереброкуруину та Ноопепту також відзначено зниження c-fos-позитивних

клітин відповідно на 19 і 6 % порівняно з контрольною групою в ранньому постнаркозному періоді.

На моделі наркозу Пропофолом вміст c-Fos-позитивних клітин у головному мозку щурів є подібним до кетамінової анестезії – підвищення значень у тварин контрольної групи в 7 разів ($p < 0,01$). Максимальний стабілізуючий вплив на рівень білка c-fos-позитивних клітин виявив Гетерозид (зниження на 29 %, $p < 0,05$). У групах Цереброкуруину та Ноопепту вміст c-fos-позитивних клітин виявився достовірно нижчим відносно контрольних показників відповідно на 22 і 20 %.

В умовах експериментального наркозу також виявлено зміни активності антиапоптотичного bcl-2-білка (табл. 2).

У контрольній групі щурів з кетаміновим наркозом відмічено зниження рівнів білка bcl-2 відносно групи інтактного на 48 %, що відображає переважання процесів некрозу нейронів у гострій стадії постнаркозних нейрональних змін. За введення Гетерозиду вміст bcl-2-білка досяг 78 % від рівня інтактного, що на 49 % перевищує показник контрольної патології. Введення Цереброкуруину в постнаркозному періоді більш позитивно вплинуло на вміст білка bcl-2, рівень якого був вищий за контрольні показники на 71 % ($p < 0,01$). У групі Ноопепту відновлення рівня bcl-2-позитивних клітин у постнаркозному періоді не виявлено.

На моделі пропофолового наркозу відзначено значне зниження рівня білка

Таблиця 1

Щільність c-fos-позитивних клітин у головному мозку щурів з наркозом Кетаміном і Пропофолом за впливу Гетерозиду, Цереброкуруину та Ноопепту ($M \pm m, n = 10$)

	Щільність c-fos позитивних клітин, у. о.	
	Кетамін	Пропофол
Інтактні тварини	12,5 ± 2,1	12,5 ± 2,1
Контроль – тварини з наркозом Кетаміном/Пропофолом	124,6 ± 5,0*	90,3 ± 2,1*
Тварини з наркозом + Гетерозид	77,5 ± 3,3 ^{*,К,Ц,Н}	64,9 ± 3,2 ^{*,К,Н}
Тварини з наркозом + Цереброкуруин	101,1 ± 5,2 ^{*,К}	70,2 ± 2,3 ^{*,К}
Тварини з наркозом + Ноопепт	117,5 ± 4,3*	72,1 ± 3,1 ^{*,К}

Примітки. Тут і в табл. 2: *достовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно інтактних тварин, ^Кдостовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи контролю, ^Цдостовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи Цереброкуруину, ^Ндостовірні ($p < 0,05$) відмінності відносно групи Ноопепту, n – кількість тварин у групі.

**Концентрація bcl-2-білка в головному мозку щурів з наркозом
Кетаміном і Пропофолом за впливу Гетерозиду, Цереброкуруину
та Ноопепту ($M \pm m, n = 10$)**

	Концентрація bcl-2-білка, у. о.	
	Кетамін	Пропофол
Інтактні тварини	45,0 ± 2,5	45,0 ± 2,5
Контроль – тварини з наркозом Кетаміном/Пропофолом	23,5 ± 1,4*	27,1 ± 2,0*
Тварини з наркозом + Гетерозид	35,0 ± 2,4*,К,Н	47,6 ± 3,7 ^{К,Н}
Тварини з наркозом + Цереброкуруин	40,2 ± 2,4*,К,Н	45,3 ± 2,6 ^{К,Н}
Тварини з наркозом + Ноопепт	24,4 ± 2,7*	36,3 ± 1,6*,К

bcl-2 відносно групи інтакту – на 40 %, яке практично повністю коригується Гетерозидом і Цереброкуруином відповідно 105 і 101 % порівняно з групою інтактних тварин. Уведення експериментальним тваринам Ноопепту також позитивно впливає на експресію bcl-2-білка – підвищує його вміст на 34 % відносно контрольних показників.

Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок, що на моделях кетамінового та пропофолового наркозу в щурів відтворено нейродеструктивні зміни тканини мозку внаслідок ішемічного постнаркозного ушкодження, які супроводжувались активізацією процесів апоптозу (зростанням кількості c-fos-позитивних клітин, зниженням вмісту bcl-2-білка) і мали відмінності на цих експериментальних моделях.

Для дії ЗА на мозок людини характерно те, що вони мають численні мішені дії (різні відділи головного мозку, спинний мозок); дія визначається фізико-хімічними властивостями агента; різні клінічні ефекти досягаються дією на різні мішені. Досліджені препарати для наркозу мають різний механізм дії – Пропофол потенціює ГАМК-ергічні механізми нейротрансмісії в ЦНС, а Кетамін пригнічує активацію NMDA-рецепторів.

Перші вказівки на те, що крім можливих позитивних ефектів Кетамін як неконкурентний антагоніст фенілциклідинового (PCP) рецептора NMDA рецепторного комплексу може викликати патологічні зміни в ЦНС, з'явилися на основі спостережень, коли підшкірне введення PCP дорослим

щурам викликало цитопатологічні зміни (вакуолізацію цитоплазми нейронів) у цереброкортикальних нейронах [12]. У цьому дослідженні вказані ефекти визначалися протягом 2 год після застосування препарату, а морфологія нейронів відновлювалася до нормального стану, якщо застосовувалася тільки одноразова доза PCP. Також Кетамін симулював ефект PCP за підшкірного введення в дозі 40 мг/кг, хоча більш низькі дози не викликали вакуолярну дегенерацію нейронів [12]. Анестезія Кетаміном у вагітних щурів може збільшити частоту автофагії та апоптозу в гіпокампі плода, і механізм може полягати в пригніченні антиоксидантної активності та накопиченні АФК [13]. Доведено, що PCP-індукована рання експресія генів, у тому числі c-fos, може бути основою поведінкових і/або психотоміметичних ефектів PCP й швидким і чутливим індикатором нелетальних ушкоджень нейронів. Ці дані було підтверджено в приматів: Кетамін викликав значну загибель нейронів у корі головного мозку плодів макак-резус, коли матерям протягом 24 год застосовували цей анестетик [14]. Подальші експерименти показали, що навіть відносно помірною дозою Кетаміну (анестетична або субанестетична – 40 і 10 мг/кг відповідно) може запустити апоптоз у головному мозку мишей, які розвиваються [15]. Також доведено, що Кетамін індукує виражену експресію c-Fos у задній поясній звивині та ретроспленіальному кортикальному шарі, у цьому разі кетамін-індукована експресія c-Fos опосередкована не тільки

NMDA-рецепторами, але також сигма-рецепторами [16]. Фізіологічний і кетамін-індукований апоптоз мають подібні паттерни розвитку, але характер ламінування та залежна від типу клітин уразливість до кетамін-індукованого апоптозу залежать від віку й активності [17]. Отже, враховуючи необхідність подальших експериментів для пояснення впливу одноразової дози Кетаміну на нейронні реакції, ці результати підтверджують, що навіть короткий апоптичний стимул може змінювати активність нейронів.

Відносно Пропофолу також відсутні беззаперечні проспективні дослідження впливу препарату на нейрональну структуру й когнітивну функцію в пацієнтів [18]. Крім того, у сучасних дослідженнях отримано морфологічні докази потенційно шкідливих ефектів Пропофолу на диференціювання нейронів та їхнє виживання – Пропофол викликає дозо-залежну втрату ГАМК-ергічних нейронів, що розвиваються, кори головного мозку новонароджених щурів [19], у тому числі в низьких, але клінічно значущих концентраціях (50 мкг/мл або більше).

В експерименті встановлено, що виразність процесів апоптозу під дією досліджених анестетиків має відмінності – уміст c-fos-позитивних клітин на 28 % нижчий, а уміст bcl-2-позитивних клітин на 15 % вищий на моделі пропофолового наркозу порівняно з кетаміновим. Ефективність експериментальної нейропротективної терапії Гетерозидом, Цереброкурином і Ноопептом також має відмінності на цих моделях. Доведено, що на експресію генів раннього реагування c-fos, який має проапоптотичні властивості (зниження щільності c-fos-позитивних клітин) – більше впливав Гетерозид, а на експресію антиапоптотичного білка

bcl-2 (підвищення концентрації bcl-2 білка) – Цереброкурин.

Таким чином, у подальшому спосіб інтраопераційної нейропротекції з використанням оригінального похідного сірко- та нітрогенвмісних гетероциклів Гетерозиду може становити безсумнівний інтерес для практичного застосування з метою профілактики ускладнень загальної анестезії.

Висновки

1. На моделях кетамінового та пропофолового наркозів у щурів (100 мг/кг) відтворено постнаркозну активацію процесів апоптозу зі зростанням щільності c-fos-позитивних клітин і зниженням вмісту антиапоптотичного bcl-2-білка, більш виразні за умов кетамінової анестезії.
2. Введення щурам на моделях кетамінового та пропофолового наркозів потенційних нейропротекторів інтраопераційного періоду – оригінального похідного сірко- та нітрогенвмісних гетероциклів з аналептичною активністю Гетерозиду, нейротрофічного церебропротектора Цереброкурину та ноотропу Ноопепту – призвело до зниження щільності c-fos-позитивних клітин та збільшення експресії bcl-2-білка, отже, на цих моделях доведено наявність у них апоптозомодулюючої активності.
3. На моделях кетамінового та пропофолового наркозів у щурів (100 мг/кг) апоптозомодулюючий ефект Гетерозиду та Цереброкурину були співвідносними, Гетерозид більш активно впливав на експресію c-Fos (зниження щільності c-fos-позитивних клітин за умов кетамінового та пропофолового наркозів) і вміст bcl-2-білка (збільшення експресії за кетамінового наркозу).

1. Perouansky M. Neurotoxicity of general anesthetics / M. Perouansky, H. C. Hemmings // *Anesthesiology*. – 2009. – V. 111, № 6. – P. 1365–1371.
2. Propofol vs Sevoflurane anaesthesia on postoperative cognitive dysfunction in the elderly. A randomized controlled trial / G. Micha, P. Tzimas, I. Zalonis [et al.] // *Acta Anaesthesiol Belg*. – 2016. – V. 67 (3). – P. 129–137.
3. Zhong X. Mood and neuropsychological effects of different doses of ketamine in electroconvulsive therapy for treatment-resistant depression / X. Zhong // *J Affect Disord*. – 2016. – V. 39, 201. – P. 124–130.
4. Perioperative cognitive evaluation / A. Borozdina, E. Qeva, M. Cinicola, F. Bilotta // *Curr Opin Anaesthesiol*. – 2018. – V. 31 (6). – P. 756–761.

5. Effects of resveratrol pretreatment on endoplasmic reticulum stress and cognitive function after surgery in aged mice / B. Wang, S. Ge, W. Xiong, Z. Xue // *BMC Anesthesiol.* – 2018. – V. 18 (1). – P. 141–147.
6. Intraoperative ketamine administration to prevent delirium or postoperative cognitive dysfunction: A systematic review and meta-analysis / F. Hovaguimian, C. Tschopp, B. Beck-Schimmer, M. Puhon // *Acta Anaesthesiol Scand.* – 2018. – V. 62 (9). – P. 1182–1193.
7. Губіна-Вакулік Г. І. Морфологічна оцінка дії кетаміну та нейропротективних властивостей пірацетаму та сульфату магнію на нейрони гіпокампа у щурів / Г. І. Губіна-Вакулік, У. А. Фесенко, В. В. М'ясоєдов // *Український морфологічний альманах.* – 2009. – Т. 7, № 4. – С. 29–34.
8. Radtke F. M. Monitoring depth of anaesthesia in a randomized trial decreases the rate of postoperative delirium but not postoperative cognitive dysfunction / F. M. Radtke // *Br J Anaesth.* – 2013. – V. 110 (Suppl. 1). – P. 98–105.
9. Kabachna I. Mechanisms of analeptic and antihypoxic effects of heterosides – derivatives for sulfur and nitrogen containing heterocycles / I. Kabachna, E. Suprun, V. Kabachnyy // *World Science.* – 2018. – V. 1, № 12 (40). – P. 29–34.
10. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: метод. рекомендации / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Л. А. Громов [и др.]. – Киев, 2016. – 80 с.
11. Кабачна І. В. Дослідження аналептичної активності похідного сірко- та азотвмісних гетероциклів на моделі кетамінового наркозу / І. В. Кабачна, С. М. Дрогозов, В. І. Кабачний, Н. Ю. Палагіна // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2017. – № 4–5 (55). – С. 27–32.
12. Olney J. W. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs / J. W. Olney, J. Labruyere, M. T. Price // *Science.* – 1989. – V. 244. – P. 1360–1362.
13. Administration of Ketamine Causes Autophagy and Apoptosis in the Rat Fetal Hippocampus and in PC12 / Li Xinran, Yanan Li, Jinghua Zhao [et al.] // *Cells. Front Cell Neurosci.* – 2018. – V. 12. – P. 21–29.
14. Ketamine-induced neurotoxicity in prenatal rhesus monkeys: distribution of neuronal damage / A. C. Scallet, R. Divine, C. Wang [et al.] // *Soc Neurosci Abst.* – 2005. – V. 251. – P. 15–23.
15. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain / C. Young, V. Jevtic-Todorovic, Y. Q. Qin [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2005. – V. 146. – P. 189–197.
16. Ketamine-induced c-Fos expression in the mouse posterior cingulate and retrosplenial cortices is mediated not only via NMDA receptors but also via sigma receptors / S. Nakao, E. Miyamoto, M. Masuzawa [et al.] // *Brain Res.* – 2002. – V. 926 (1–2). – P. 191–196.
17. Ketamine-induced apoptosis in the mouse cerebral cortex follows similar characteristic of physiological apoptosis and can be regulated by neuronal activity / Qi Wang, Feng-yan Shen, Rong Zou [et al.] // *Mol Brain.* – 2017. – V. 10. – P. 24–31.
18. Selective toxicity of the general anesthetic propofol for GABAergic neurons in rat brain cell cultures / P. Honegger, J. M. Matthieu // *J Neurosci Res.* – 1996. – V. 45. – P. 631–636.
19. Differential neurotoxic effects of propofol on dissociated cortical cells and organotypic hippocampal cultures / I. Spahr-Schopfer, L. Vutskits, N. Toni [et al.] // *Anesthesiology.* – 2000. – V. 92. – P. 1408–1417.

Е. В. Супрун, І. В. Кабачна, В. І. Кабачний, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтіярова
Модуляція процесів нейроапоптозу в щурів після кетамінового та пропофолового наркозів під впливом Гетерозиду

З метою поліпшення анестезіологічної безпеки під час оперативних втручань перспективним напрямом може бути розширення асортименту засобів первинної та вторинної нейропротекції шляхом цілеспрямованого синтезу потенційних нейропротекторів з аналептичними властивостями, що діють як аналептики на ті самі структури, які остаточно пригнічені самим центральним анестетиком або його активними метаболітами. У зв'язку з цим обґрунтованим і перспективним є пошук серед похідних сірко- та нітрогенвмісних гетероциклів (гетерозидів) універсальних, нешкідливих нейропротекторів з аналептичною дією.

Мета дослідження – порівняти нейропротективну активність Гетерозиду і референс-препаратів – нейротрофічного церебропротектора Цереброкуруину та ноотропу Ноопепту за умов експериментального наркозу Кетаміном і Пропофолом за впливом на вміст у головному мозку щурів проапоптозного білка c-Fos й антиапоптозного bcl-2-білка.

Дослідження проведено на 90 білих безпородних щурах віком 6 міс. масою 220–290 г. Кетамінову та пропофолову анестезії проводили шляхом введення 100 мг/кг відповідно Кетаміну/Пропофолу внутрішньоочеревинно (в/о). Після виходу тварин з наркозу їм одноразово вводили препарати в таких дозах: Гетерозид – в/о 2 мг/кг, Цереброкуруин – в/о 0,2 мг/кг, Ноопепт – інтраназально 10 мкг/кг. Для виявлення експресії c-Fos в CA1 зоні гіпокампа використовували імуногістохімічний метод непрямой імунофлуоресценції. Концентрацію bcl-2 у цитоплазматичній фракції головного мозку визначали методом Вестерн-блот аналізу.

Аналіз отриманих результатів показав, що на моделях кетамінового та пропофолового наркозу в щурів (100 мг/кг) відтворено постнаркозну активізацію процесів апоптозу зі зростанням щільності

c-fos-позитивних клітин і зниженням умісту антиапоптотичного bcl-2-білка, більш виразні в умовах кетамінової анестезії. Введення наркотизованим щурам потенційних нейропротекторів інтраопераційного періоду – оригінального похідного сірко- та нітрогенвмісних гетероциклів з аналептичною активністю Гетерозиду, референтних препаратів Цереброкуруину та Ноопепту – призвело до зниження щільності c-fos-позитивних клітин і збільшення експресії bcl-2-білка в мозку, отже, на цих моделях доведено наявність у Гетерозиду, Цереброкуруину та Ноопепту апоптозомодулюючої активності. На моделях кетамінового та пропофолового наркозу в щурів апоптозомодулюючий ефект Гетерозиду та Цереброкуруину були співвідносними, Гетерозид більш активно впливав на експресію c-Fos (зниження щільності c-fos-позитивних клітин за умов кетамінового та пропофолового наркозу) і вміст bcl-2-білка (на моделі кетамінового наркозу).

Ключові слова: Кетамін, Пропофол, нейропротекція, апоптоз, c-fos-позитивні клітини, bcl-2-білок

Э. В. Супрун, И. В. Кабачная, В. И. Кабачный, А. В. Абрамов, Н. В. Бухтиярова Модуляция процессов нейроапоптоза у крыс после кетаминowego и пропофолового наркозов под влиянием Гетерозидов

С целью улучшения анестезиологической безопасности во время оперативных вмешательств перспективным направлением может быть расширение ассортимента средств первичной и вторичной нейропротекции путем целенаправленного синтеза потенциальных нейропротекторов с аналептическим действием, действующих как аналептики на те же структуры, которые подавлены непосредственно центральным анестетиком или его активными метаболитами. В связи с этим обоснованным и перспективным является поиск среди производных серо- и азотсодержащих гетероциклов (гетерозидов) универсальных, безвредных нейропротекторов с аналептическим эффектом.

Цель исследования – сравнить нейропротективную активность Гетерозидов и референтных препаратов церебропротектора Цереброкуруина и ноотропа Ноопепта в условиях экспериментального наркоза Кетамином и Пропофолом по влиянию на содержание в тканях головного мозга крыс проапоптотического белка c-Fos и антиапоптотического bcl-2-белка.

Исследование проведено на 90 белых беспородных крысах 6 мес. возраста массой 220–290 г. Кетаминую и пропофоловую анестезии проводили путем введения 100 мг/кг соответственно Кетамина/Пропофола внутривенно (в/в). По выходу животных из наркоза им однократно вводили препараты в следующих дозах: Гетерозид – в/в 2 мг/кг, Цереброкуруин – в/в 0,2 мг/кг, Ноопепт – интраназально 10 мг/кг. Для выявления экспрессии c-Fos в СА1 зоне гиппокампа использовали иммуногистохимический метод непрямой иммунофлуоресценции. Концентрацию bcl-2 белка в цитоплазматической фракции головного мозга определяли методом Вестерн-блот анализа.

Анализ полученных результатов показал, что на моделях кетаминowego и пропофолового наркоза у крыс (100 мг/кг) воспроизведена постнаркозная активизация процессов апоптоза по показателям роста плотности c-fos-позитивных клеток и снижению содержания антиапоптотического bcl-2-белка, более выраженные в условиях кетаминовой анестезии. Введение наркотизированным Кетамином и Пропофолом крысам потенциальных нейропротекторов интраоперационного периода – оригінального производного серо- и азотсодержащих гетероциклов с аналептической активностью Гетерозидов и референтных препаратов Цереброкуруина и Ноопепта – привело к снижению плотности c-fos-позитивных клеток и увеличению экспрессии bcl-2-белка в мозге, следовательно, на этих моделях доказано наличие у Гетерозидов, Цереброкуруина и Ноопепта апоптозомодулирующей активности. На моделях кетаминowego и пропофолового наркоза у крыс апоптозомодулирующий эффект Гетерозидов и Цереброкуруина были сопоставимыми, Гетерозид более активно влиял на экспрессию c-Fos (снижение плотности c-fos-позитивных клеток в условиях кетаминowego и пропофолового наркоза) и содержание bcl-2-белка (на модели кетаминowego наркоза).

Ключевые слова: Кетамин, Пропофол, нейропротекция, апоптоз, c-fos-положительные клетки, bcl-2-белок

E. V. Suprun, I. V. Kabachnaya, V. I. Kabachnyy, A. V. Abramov, N. V. Bukhtiyarova Modulation of neuroapoptosis processes after ketamine and propofol anesthesia in rats under the influence of Heteroside

In order to improve anaesthetic safety during surgical interventions, a promising direction may be the expansion of the range of primary and secondary neuroprotection drugs by means of targeted synthesis of potential neuroprotectors with analeptic action. It is reasonable and promising to search an universal, harmless neuroprotectors with analeptic action among the derivatives of sulfur- and nitrogen-containing heterocycles (Heteroside).

The purpose of the research was to compare the neuroprotective activity of Heteroside and reference medications – the neurotrophic cerebroprotector Cerebrocurin and nootropic Noopept after experimental anesthesia with Ketamine and Propofol by its effect on the content of proapoptotic c-Fos protein and antiapoptotic bcl-2 protein in the rat brain tissue.

The research was carried out on 90 white outbred rats of 6 months age, with weight of 220–290 g. Ketamine/Propofol anesthesia was performed by intraperitoneal (i/p) injection of anesthetic at a dose 100 mg/kg.

After recovery from anesthesia animals were once administered with drugs in the following doses: Heterosides 2 mg/kg (i/p), Cerebrocurin 0,2 mg/kg (i/p), Noopept 10 mg/kg intranasally. To detect the expression of c-Fos in the CA1 zone of the hippocampus an immunohistochemical indirect immunofluorescence method was used. The concentration of bcl-2 in the cytoplasmic fraction of the brain was determined by western blot analysis.

The analysis of results obtained proved that models of ketamine and propofol anesthesia on rats reproduced postanesthesia activation of apoptosis processes by increasing the density of c-fos-positive cells and reducing the content of anti-apoptotic bcl-2 protein, more pronounced in ketamine anesthesia. Neuroprotectors administration (Heteroside, Cerebrocurin, Noopept) at postanesthesia period led to lowering of c-fos-positive cells density and increasing of bcl-2 protein expression. Thus, the experiment on these models proved the presence of apoptosis-modulating activity of Heteroside, Cerebrocurin and Noopept. On the models of Ketamine and Propofol anesthesia in rats apoptosis-modulating effect of Heteroside and Cerebrocurin were comparable. Heteroside was found to be more active influencing the expression of c-Fos (by reducing the density of c-fos-positive cells after Ketamine and Propofol anesthesia) and the content of bcl-2 protein (on the model of Ketamine anesthesia).

Key words: Ketamine, Propofol, neuroprotection, apoptosis, c-fos-positive cells, bcl-2-protein

Надійшла: 10 січня 2019 р.

Контактна особа: Супрун Еліна Владиславівна, доктор медичних наук, професор, Національний фармацевтичний університет МОЗ України, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002.
Тел.: + 38 0 67 972 96 77.