

УДК 577.3:547.857.4:616.831-005.4

Е. В. АЛЕКСАНДРОВА, Д. Н. ЮРЧЕНКО, Н. И. РОМАНЕНКО, Н. В. КРИСАНОВА,  
С. В. ЛЕВИЧ, А. С. ШКОДА, Л. В. ЕВСЕЕВА, О. Б. МАКОЕД, Н. П. РУДЬКО  
Л. Е. БЕЛОКОНЬ

Запорожский государственный медицинский университет

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ И ВЛИЯНИЯ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН НЕЙРОНОВ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО КСАНТИНА С-3 В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Данная статья содержит результаты исследования влияния на энергетический обмен нейронов, а также мембранопротекторных свойств нового производного ксантина в условиях развития глобальной ишемии головного мозга. Соединение С-3 по силе мембранопротекторного действия, направленного против ишемического повреждения и по энергомодулирующему эффекту, превышало препарат мексидол

**Ключевые слова:** ишемия головного мозга, мембранопротекция, производное ксантина.

### ВВЕДЕНИЕ

Глобальная церебральная ишемия головного мозга часто возникает у пациентов при остановке сердца, шоке, асфиксии и у пациентов, перенесших сложные операции на сердце. Нарушения, затрагивающие нервную ткань, в условиях ишемии приводят к спектру таких последствий, как: кома, судороги, ишемический инсульт и когнитивные нарушения. У пациентов после остановки сердца с последующей реанимацией глобальная ишемия головного мозга развивается на фоне системной гипоперфузии, возникающей при облитерирующем эндартериите крупных сосудов или без него [8, 12, 13, 17].

В последние двадцать лет активно ведутся исследования по разработке цитопротекторной стратегии по ликвидации последствий острой (короткой, в минутах), длительной (более 24 часов) ишемии головного мозга, отягченной развитием апоптоза и некроза нейронов. Известно, что в условиях развития церебральной ишемии, сопровождающей ишемические инсульт, происходят нарушения в энергетическом обмене нейронов [8]. Данное состояние стимулирует увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий, что приводит к нарушению окислительного фосфорилирования, уходу в цитоплазму цитохрома С. Длительная ишемия приводит к разрушению внешней мембраны

митохондрий за счет стимуляции перекисного окисления липидов и синтеза нескольких проапоптотических факторов (каспаз, эндонуклеаз, других протеаз, которые относят к классу интерлейкин-1 $\beta$ -превращающих ферментов) [6, 16]. В указанных условиях возможны необратимые изменения в метаболических путях нейронов и их цитоскелете и, как следствие, апоптоз [5, 15].

Комплексная терапия ишемических инсультов имеет в своем арсенале ряд препаратов, обладающих антигипоксическим, мембранопротекторным, ноотропным действием. Однако, к сожалению, дифференциальный подход в выборе фармацевтических препаратов для терапии зачастую отсутствует, так как далеко не всё изучено по механизмам развития церебральной ишемии в зависимости от временного фактора и причин её развития.

В данной статье представлены данные по изучению мембранопротекторного действия и влияния на показатели энергетического обмена нейронов производного теofilлина С-3 (гидразида 1,3-диметил-8-N-бензиламиноксантинил-7-уксусной кислоты), которое синтезировано сотрудниками кафедры биохимии и лабораторной диагностики ЗГМУ. В качестве препарата сравнения был выбран мексидол, имеющий антигипоксическое, мембранопротекторное, ноотропное, противосудорожное и ангиолитическое действия.

В клинике мексидол назначают пациентам с кислород-зависимыми патологическими состояниями (шок, гипоксия, ишемия, нарушения мозгового кровообращения) [18].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки влияния синтезированного вещества С-3 на показатели энергетического обмена в условиях развития ишемии и его мембранопротекторного действия была использована модель неполной глобальной ишемии головного мозга (ГИГМ), которую проводили на крысах линии Вистар обоих полов массой 220-260 г. Модель ГИГМ воспроизводилась двухсторонней перекруткой общих сонных артерий под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг) [1-3].

В исследовании использовались группы животных: 1) интактные — псевдооперированные животные (под вышеуказанным наркозом хирургически выделяли сонные артерии, но лигатура не накладывалась, n=5); 2) контрольные животные — воспроизводилась модель ГИГМ, n=5); 3) животные с ГИГМ на фоне введения соединения С-3, n=5); 4) животные с ГИГМ на фоне введения мексидола, n=5) [1].

Вещество С-3 и мексидол вводились *per os* в виде суспензии один раз в сутки в дозе 250 мг/кг. На четвертые сутки после воспроизведения ГИГМ проводилась декапитация животных. Временной период развития ГИГМ (72 часа) выбран таким образом, чтобы оценить спектр влияния синтезированного вещества на все направления механизма развития ишемического повреждения, включая возможные некроз и апоптоз нейронов. Для исследований использовались цитозольная фракция лобных долей коры головного мозга крыс, экстракт ткани, лишенный белков, и сыворотка крови животных [2].

В цитозольной фракции определяли содержание интермедиатов, которые используются для оценки состояния энергетического обмена: АТФ, АДФ, АМФ, пируват, малат, лактат [4].

Мембранопротекторное действие синтезированного вещества оценивали по изменению содержания в цитозольной фракции продуктов окислительной модификации белков — нейротоксичных альдегидфенилгидразонов (АФГ) и кетондинитрофенилгидразонов (КФГ) [10].

Степень поражения цитоплазматической мембраны нейронов оценивали во всех исследуемых группах животных по изменению активности в сыворотке крови органоспецифичной изоформы ВВ креатинфосфокиназы (ВВ-КФК) [2].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все группы животных, за исключением интактных, имели на 4-е сутки тяжелые неврологические изменения по McSwow: паралич, парез, птоз. Такая симптоматика была максимально выраженной в контрольной группе с ГИГМ и в группе животных с ГИГМ на фоне введения соединения С-3. Однако летальность животных в группе с введением соединения С-3 на 4-е сутки была минимальной (7%), при терапии мексидолом — 47%, в контрольной группе летальность составляла 67%.

*Исследование мембранопротекторных свойств соединения С-3 в условиях экспериментальной неполной глобальной ишемии головного мозга.*

В таблице 1 представлены данные по содержанию нейротоксичных продуктов АФГ, КФГ в цитозольной фракции нейронов лобных долей коры головного мозга крыс в корреляции с изменением активности ВВ-КФК в сыворотке крови животных всех исследуемых групп.

Накопление АФГ и КФГ в ишемизированных нейронах приводит к необратимым изменениям в структуре белков, липидов мембран, в структуре ДНК [8]. Это, в свою очередь, ведет к деполяризации мембран нейронов. Здоровый мозг умеет быстро поглощать внеклеточный глутамат, однако в условиях, когда запасы энергии истощаются, как при ишемии, из-за клеточной деполяризации происходит утечка глутамата во внеклеточное пространство. Нарушение поглощения глутамата приводит к увеличению внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Увеличение пула внутриклеточного кальция запускает целый каскад метаболических нарушений, сопровождающихся фосфорилированием белков и активацией  $Ca^{2+}$  — зависимого протеолиза [8].

Аналогичная ситуация складывается и с поглощением цистеина при деполяризации мембран, что вызывает истощение в нейронах запасов глутатиона, используемого антиоксидантными системами для защиты от окислительного стресса, что также приводит к повреждению нейронов [7].

У животных с ГИГМ на 4-е сутки в цитозоле нейронов наблюдалось достоверное накопление нейротоксичных продуктов АФГ (в 2,5 раза) и КФГ (в 4 раза) по отношению к соответствующим значениям у интактных животных. Параллельно при этом происходило повышение активности ВВ-КФК в сыворотке крови (в 4 раза) по отношению к аналогичному показателю у интактных животных. Данный факт подтверждал повреждение цитоплазматической мембраны нейронов, так

как ВВ-КФК является органоспецифичным изоферментом для головного мозга и его высшая

активность наблюдается во внутренней мембране митохондрий и цитозоле нейронов коры [13].

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ С-3 НА СОДЕРЖАНИЕ АФГ И КФГ В ЦИТОЗОЛЬНОЙ ФРАКЦИИ НЕЙРОНОВ И АКТИВНОСТЬ ВВ-КФК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖИВОТНЫХ С ГИГМ**

Группы животных (n=5)	АФГ (270 нм) у.е./г белка	КФГ (363 нм) у.е./г белка	ВВ-КФК ммоль/л*час
Интакт	5,7±0,42	7,2±0,37	0,04±0,003
Контрольные с ГИГМ	17,5±1,12	28,6±1,76	0,17±0,005
ГИГМ + С-3	6,0±0,35*§	8,7±0,26*§	0,060±0,001*§
ГИГМ + мексидол	11,1±1,11*	17,1±1,4	0,093±0,005*

Примечание: \* — p<0,05 по отношению к контрольной группе; § — p<0,05 по отношению к группе животных, которые получали мексидол

Введение соединения С-3 животным с ГИГМ существенно и достоверно снижало содержание нейротоксичных продуктов по сравнению с контрольной группой животных: АФГ на 66% и КФГ на 70%, а также снижало активность ВВ-КФК в сыворотке крови животных на 65% по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе животных, что свидетельствовало о меньшей степени поражения цитоплазматической мембраны нейронов в присутствии исследуемого вещества. Мексидол оказывал аналогичное действие на изменение выше указанных показателей, но его эффект не был настолько ярко выраженным (табл. 1).

**Влияние соединения С-3 на содержание показателей энергетического обмена нейронов при глобальной ишемии головного мозга**

Как и следовало ожидать, экспериментальная ГИГМ привела в цитозольной фракции нейронов к снижению АТФ на 46%, причем снижалась и концентрация АДФ (на 54,8%) на фоне накопления АМФ (на 125%) по отношению к соответствующим показателям у интактных крыс (рис. 1).

Ишемическое повреждение нейронов сопровождается изменением проницаемости мембран, в том числе и внутренней мембраны митохондрий. Это ведет к снижению скорости окислительного фосфорилирования, нарушению функции АТФ/АДФ-транслоказы и к стимуляции ферментов, участвующих в разрушении адениловых нуклеотидов, что сопровождается накоплением в цитозоле АМФ [14].

Длительная гипоксия приводит к стимуляции анаэробного гликолиза в цитоплазме нейронов, что подтверждалось в условиях экспериментальной ГИГМ повышением на 240% содержания лактата в цитозольной фракции по

отношению к соответствующему показателю у интактной группы животных. Следует отметить, что АМФ при его накоплении в цитозоле выступает в качестве аллостерического активатора фосфофруктокиназы-1 — регуляторного фермента гликолиза, лимитирующего скорость течения процесса [9].

Поэтому данные эксперимента по показателям АМФ и лактату в контрольной группе животных имеют прямую корреляционную зависимость. Снижение концентрации малата в цитоплазме нейронов при экспериментальной ГИГМ на 53,9% по отношению к показателю интактных крыс, обусловлено переключением нейронов с аэробного окисления на анаэробное в условиях гипоксии [8].

Но, при этом не происходило накопление пирувата, его концентрация снизилась при ГИГМ на 30,1%, что можно объяснить стимуляцией его превращения в лактат и, возможно, активным включением пирувата в трансминирование с образованием из него аланина. Последнее превращение выполняет вспомогательную функцию в адаптивном метаболическом ответе на ишемическое повреждение нейронов — стимулирование синтеза белков на замену поврежденных структурных компонентов клетки [11].

Введение лекарственного препарата мексидола и соединения С-3 на фоне экспериментальной ишемии существенно меняло значение показателей энергетического обмена на 4-е сутки её развития. Наиболее значительные изменения в сторону нормализации показателей энергетического обмена (АТФ, АДФ, АМФ, пирувата, малата) наблюдались при введении в организм крыс вещества С-3. Пул АТФ на фоне его введения увеличился на

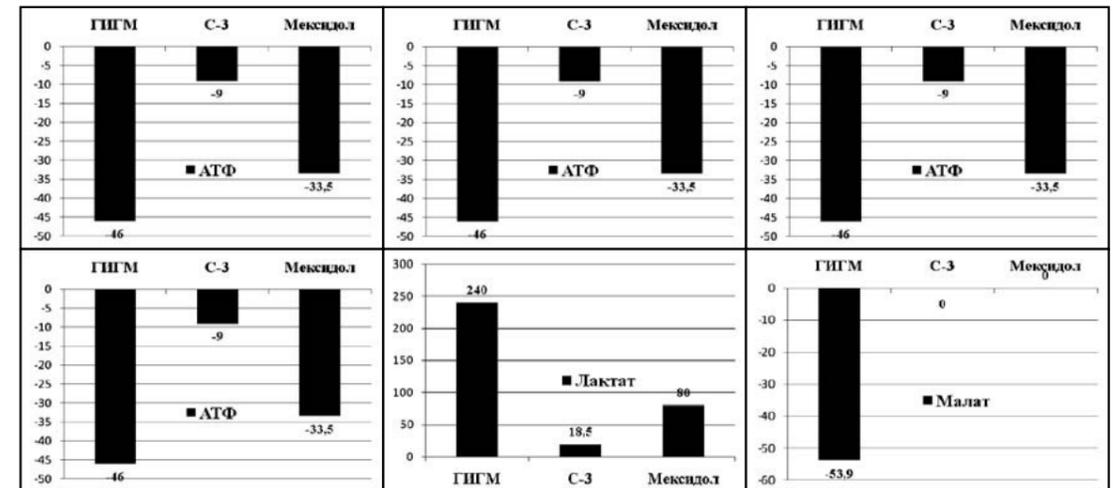


Рис. 1. Сравнительная диаграмма процентного снижения (повышения) показателей энергетического обмена нейронов в контрольной группе крыс с ГИГМ и при введении соединения С-3 и мексидола в организм животных с ГИГМ по отношению к аналогичным показателям у интактных животных

37%, у мексидола аналогичный эффект составлял только 12,5%. Содержание АДФ и АМФ в цитозольной фракции на фоне введения соединения С-3 практически достигало значений у интактных животных. При этом содержание лактата в цитозоле снижалось при действии вещества С-3 на 221,5% по отношению к аналогичному показателю в контрольной группе животных с ГИГМ.

**ВЫВОДЫ**

Синтезированное соединение С-3 обладает ярко выраженным мембранопротекторным действием и по исследованным показателям оценки данных свойств (содержание АФГ, КФГ, активность ВВ-КФК в сыворотке крови) более активно, чем препарат мексидол.

Соединение С-3 оказывает модулирующее действие на состояние показателей энергетического обмена в условиях длительной экспериментальной неполной глобальной ишемии головного мозга.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ**

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, О. С. Шкода, Н. В. Бухтіярова // Запороз. мед. журн. — 2012. — № 5 (74). — С. 8-11.
2. Медикаментозная защита головного мозга при моделировании ишемии и реперфузии

3. Поварова О. В. Влияние фенол-т-бутилнитрона, мексидола и нооглютилы 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.
4. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен); под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во Ленинградского ун-та. — 1982. — 272 с.
5. Mechanisms of ischemic brain damage. / Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, et al. // Curr Cardiol Rep. — 2003. — № 5. — P. 160-167.
6. Graham S.H. Programmed cell death in cerebral ischemia. / S. H. Graham J. Chen // J. of Cereb Blood Flow Metab. — 2001. — № 21. — P. 99-109.
7. Choi D.W. Excitotoxic cell death. / J. of Neurobiol. — 1992. — № 23. — P. 1261-1276.
8. Izumi Harukuni. Mechanisms of Brain Injury after Global Cerebral Ischemia / Izumi Harukuni, Anish Bhardwaj // Neurol Clin. — 2006. — № 24 — P. 1-21.
9. Jenkins C. M. Reversible high affinity inhibition of phosphofruktokinase-1 by acyl-CoA: a mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism / C. M. Jenkins, J. Yang, H. F. Sims, R. W. Gross // J. of

- Biol. Chem. — 2011 Apr 8. — № 286(14). — P. 11937-11950.
10. Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J. M. Gutteridge // Clarendon Press, Oxford, 2007. — Ed 4. — 704 p.
  11. Liu J. Z. Effects of ATP concentration and hypoxic exposure on RNA and protein synthesis activity in isolated mitochondria from rat brain // J. Z. Liu, W. X. Gao, M. C. Cai et al. // Sheng Li Xue Bao. — 2002, Dec 25. — № 54 (6). — P. 485-489.
  12. Llinas R. Neurologic complications of cardiac surgery / R. Llinas, D. Barbut, L. R. Caplan // Prog. Cardiovasc. Dis. — 2000 — № 43. — P. 101-112.
  13. Murkin J. M. Etiology and incidence of brain dysfunction after cardiac surgery / J. of Cardiothorac Vasc Anesth. — 1999. — № 13. — P. 12-37.
  14. Pimentel V. C. Hypoxia-ischemia alters nucleotide and nucleoside catabolism and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the cerebral cortex of rats / V. C. Pimentel, D. Zanini, A. M. Cardoso et al. // Neurochem Res. — 2013, Apr — № 38(4). — P. 886-94.
  15. Samdani A. F. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia / A. F. Samdani, T. M. Dawson, V. L. Dawson // Stroke. — 1997. — № 28. — P. 1283-1288.
  16. Sugawara T. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia / T. Sugawara, M. Fujimura, N. Noshita, et al. // Neuro Rx. — 2004. — № 1. — P. 17-25.
  17. Wityk R. J. Diffusion- and perfusion-weighted brain magnetic resonance imaging in patients with neurologic complications after cardiac surgery / R. J. Wityk, M. A. Glodsbrough, A. Hillis et al. // Arch. Neurol. — 2001. № 58. — P. 571-576.
  18. <http://medi.ru/doc/a070196.htm>

УДК 577.3:547.857.4:616.831-005.4

**К. В. Александрова, Д. М. Юрченко, М. І. Романенко, Н. В. Крісанова, С. В. Левіч, О. С. Шкода, Л. В. Євсєєва, О. Б. Макоїд, Н. П. Рудько, Л. С. Білоконь**  
Запорізький державний медичний університет

#### ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА ВПЛИВУ НА ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН НЕЙРОНІВ НОВОГО ПОХІДНОГО КСАНТИНУ С-3 В УМОВАХ РОЗВИТКУ ГЛОБАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Дана стаття містить результати досліджень впливу на енергетичний обмін нейронів, а також мембранопротекторні властивості нового похідного ксантину в умовах розвитку глобальної ішемії головного мозку. Сполука С-3 за силою мембранопротекторної дії направленої проти ішемічного пошкодження і за енергомодуючим ефектом перевищувало препарат мексидол

**Ключові слова:** ішемія головного мозку, мембранопротекція, похідне ксантину

UDC 577.3:547.857.4:616.831-005.4

**K. V. Alexandrova, D. M. Yurchenko, M. I. Romanenko, N. V. Krisanova, S. V. Levich, O. S. Shkoda, L. V. Yevseeva, O. B. Makoyid, N. P. Rudko, L. E. Bilokon**  
Zaporizhzhya State Medical University

#### THE INVESTIGATION OF NEW XANTHINE DERIVATIVE C-3 INFLUENCE ON ENERGY METABOLISM AND IT NEURONAL MEMBRANE PROTECTION UNDER GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA DEVELOPMENT

This article contains results for the investigation of new xanthine derivative influence on energy metabolism and it neuronal membrane protection under global cerebral ischemia development. The compound C-3 is discussed, as the most effective in protection against ischemic inquiry of neuronal membranes and in modulatory effects on energy metabolism in comparison with preparation Mexidol

**Key words:** cerebral ischemia, membrane protection, derivative of xanthine

Адреса для листування:

69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26  
тел.: 0612-34-24-42

Надійшла до редакції:

26.06.2013 р.

УДК 615.015:547.857.4

М. Г. БАКУМЕНКО

Національний фармацевтичний університет

## ВЛИЯНИЕ 7, 8-ДИЗАМЕЩЕННЫХ-3-МЕТИЛ-КСАНТИНОВ НА ВИСЦЕРАЛЬНУЮ СТИМУЛЯЦИЮ И ТЕЧЕНИЕ ФЛОГОГЕННОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

Целью настоящего исследования было изучение противовоспалительной и анальгетической активностей впервые синтезированных 7, 8-дизамещенных-3-метилксантина. Выявленное соединение *b*-окси-*g*-(*p*-нитрофенокси)пропил 3-метил-7-алкил-8-пиперидиноксантин, обладает обезболивающим действием (уменьшает количество укусных корчей на 42,4%). Соединение *b,g*-диоксипропил 3-метил-7-алкил-8-морфолиноксантин, обладает выраженным антиэкссудативным действием (уменьшает развитие экспериментального каррагенинового отека лапки у крыс на 36,3%).

Установлено, что 7, 8-дизамещенные-3-метилксантины являются перспективной группой органических соединений для дальнейшего целенаправленного проведения синтеза и фармакологического скрининга с целью создания на их основе фармакологических веществ с анальгетическими и противовоспалительными свойствами.

**Ключевые слова:** 7, 8-дизамещенные-3-метилксантины, анальгетическая активность, противовоспалительная активность

В настоящее время, более 30 миллионов людей ежедневно принимают НПВС, из них 40% пациенты возрастом старше 60 лет. Около 20% всех больных находящихся на лечении в стационаре принимают НПВС.

Сравнительная дешевизна и эффективность расширили сферу их применения в различных разделах клинической медицины и обеспечили необычайную популярность этих препаратов у населения.

Они широко применяются в амбулаторной и стационарной медицинской практике, стоматологии, травматологии, в практике МЧС, скорой медицинской помощи, а также в анестезиологии, реаниматологии и интенсивной терапии.

Центральный анальгетический эффект связан с их непосредственным влиянием на синтез простагландинов в головном и спинном мозге. Периферическое действие связано в основном с влиянием на циклооксигеназный путь превращения арахидоновой кислоты.

При применении НПВП возникает потенциальная опасность побочных реакций со стороны ЖКТ (язвенно-эрозивные процессы, кровотечения), почек (уменьшение экскреции натрия, нефротоксическое действие), легких (бронхо-

спазм), гемостаза (антиагрегационное действие, геморрагии), аллергенности (кожные проявления, эпидермальный некролиз, отек Квинке), а также такие проявления, как васкулиты, перикардит, миокардит, стоматит.

Широкое внедрение в клиническую практику НПВП нового класса — селективных (нимесулид, и др.) и специфических ингибиторов ЦОГ-2 (коксибов) позволило в значительной степени снизить количество побочных реакций НПВП в терапевтической клинике. Однако при длительном приеме специфических ингибиторов ЦОГ-2 потенциальный риск все же остается, что не позволяет считать их «идеальными» препаратами класса НПВП.

В то время как неселективные НПВС таят угрозу развития язвенного поражения желудка и двенадцатиперстной кишки, вследствие снижения синтеза гастропротекторных простагландинов, селективные блокаторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) несут угрозу развития тромботических осложнений, в том числе инфаркта миокарда.

В связи с побочными эффектами НПВС, ограничивающих их применение у большой группы пациентов, ведется поиск новых фармакологических веществ, обладающих противовоспалительными свойствами.