

УДК 615.27:612.82.015.3

© Беленичев И.Ф., Павлов С.В., Бухтиярова Н.В., Абрамов А.В., Коваленко С.И., Егоров А.А., 2006

## **ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ХИНАЗОЛИНА (ПК-66) И СЕМАКСА НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА**

**Беленичев И.Ф., Павлов С.В., Бухтиярова Н.В., Абрамов А.В., Коваленко С.И., Егоров А.А.**

*Кафедра патологической физиологии (зав. – проф. Ю.М. Колесник)*

*Запорожский государственный медицинский университет*

**Ключевые слова:** хиназолин, семакс, энергетический метаболизм, головной мозг, модель, иммобилизационный стресс.

**Введение.** Увеличение во всем мире числа неинфекционных заболеваний, в возникновении и развитии которых важную, а иногда, и решающую роль играет стресс-реакция, диктует настоятельную необходимость исследования основных патобиохимических процессов, возникающих при длительном стрессе и поиск новых, высокоэффективных стресспротективных средств [7, 9]. Одним из важнейших компонентов, вызывающих при стрессе структурно-функциональные повреждения, особенно клеток нервной ткани, является сопряженный с активацией свободно-радикальных процессов, энергодефицит [5-7]. Суммарный эффект энергодефицита, окислительной модификации макромолекул и нарушения транспорта кислорода, обуславливает комплекс изменений, приводящих в начале к резкому изменению активности нейрона (возбудимость, проводимость, секреторная и инкреторная активность), а затем и к его гибели [6, 9].

В настоящее время для нейропротекции стресс-зависимых повреждений головного мозга применяют антиоксиданты, ноотропы, энерготропы, метаболитотропы и др. [6, 9].

Нашими предыдущими исследованиями была показана значительная церебропротективная активность производных хиназолина, модифицированных по 4 положению введением дипептидного остатка, включающего в себя глицин, в условиях стресса [1-3].

**Цель нашего исследования** - оценка стресспротективного действия производного хиназолина (ПК-66) и ноотропного препарата семакс по влиянию на процессы окислительного метаболизма (окисление в цикле Кребса, гликолиз и активность ГАМК-шунта) в головном мозге крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

**Материалы и методы.** Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 220-240 г, полученных из питомника ИФТ АМН Украины. Хронический иммобилизационный стресс вызывали жесткой ежедневной иммобилизацией животных на спине в течение 2 часов на протяжении 10 дней. Исследуемые препараты вводили ежедневно в течение 10 дней за полчаса до иммобилизации в следующих дозах: – ПК-66 – 10 мг/кг, семакс – 300 мг/кг внутривнутрибрюшинно.

Через час после последней иммобилизации, крыс выводили из эксперимента под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). У животных вскрывали черепную коробку, извлекали мозг и гомогенизировали в жидком азоте. Для биохимических исследований точную навеску гомогената помещали в охлажденный раствор 0,15М КС1(+4С) в соотношении 1:40 и выделяли цитозольную фракцию методом центрифугирования (15000g). Безбелковый экстракт получали добавлением точной навески гомогената мозга в хлорную кислоту (0,6М), с последующей нейтрализацией 5,0М К2СО3. Состояние биоэнергетики и окисления в цикле Кребса оценивали по уровню адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ), лактата, малата, изоцитрата, активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохромоксидазы [14, 16, 17].

Также изучалась активность ГАМК-ергической системы и уровень сопряженных с ней тормозных аминокислот, являющихся субстратом для компенсаторного цикла образования энергии. Определялось содержание глицина, ГАМК, глутамата, а также активность ключевых ферментов –

глутаматдекарбоксилазы (ГДК) – фермента, ответственного за образование ГАМК из глутамата, и ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т), фермента, ответственного за превращения ГАМК в процессе его тормозного действия [15].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием компьютерной программы «Biostat».

**Результаты и их обсуждение.** Моделирование ХИС приводит к нарушениям энергетического обмена. Так, в тканях мозга стрессированных крыс, по сравнению с интактной группой, наблюдалось уменьшение уровня АТФ на 37 %, АДФ - на 18,6 % и повышение АМФ - на 50 %. Снижение энергетических ресурсов головного мозга происходило на фоне дискоординации реакций цикла Кребса, о чем свидетельствовало снижение уровня малата на 47,3 %; изоцитрата - на 47,8 %; угнетение активности СДГ - на 54,2 % и цитохром-С-оксидазы - на 27,2 %. Наблюдалась компенсаторная активация гликолиза, что выражалось в увеличении содержания лактата в тканях мозга на 80,7 %.

В результате исследований была выявлена значительная активация ГАМК-ергической системы, выражающаяся в повышении уровня ГДК на 23 %, ГАМК-Т - на 53,8 % и снижении глутамата на 60 %, а ГАМК - на 64,9 %. Параллельно регистрировалось снижение глицина на 31,5 % (табл. 1-3).

**Таблица 1.** Влияние ПК-66 и семакса на содержание адениловых нуклеотидов в мозге крыс при ХИС

Группы животных	АТФ, мкм/г ткани	АДФ, мкм/г ткани	АМФ, мкм/г ткани
Интактная	2,86±0,06	0,43±0,02	0,14±0,01
ХИС (контроль)	1,80±0,04	0,35±0,02	0,21±0,02
ХИС + семакс	2,48±0,02*	0,40±0,01*	0,14±0,01*
ХИС + ПК-66	2,76±0,01*°	0,42±0,01*	0,14±0,01*

**Примечание.** \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю; ° -  $p < 0,05$  по отношению к семаксу.

**Таблица 2.** Влияние ПК-66 и семакса на показатели ГАМК-ергической системы и содержание тормозных аминокислот в мозге у крыс при ХИС

Группы животных	ГАМК, мкм/г ткани	Глутамат, мкм/г ткани	Глицин, мкм/г ткани	ГДК, мкм/г ткани/ч	ГАМК-Т, мкм/г ткани/ч
Интактная	2,87±0,12	14,88±0,1	3,58±0,11	13,0±0,8	13,7±0,7
ХИС (контроль)	1,0±0,09	6,0±0,07	2,45±0,07	16,05±0,2	20,6±0,4
ХИС + семакс	2,4±0,11*	8,85±0,08*	3,0±0,08	14,8±0,6	14,6±0,6
ХИС + ПК-66	2,6±0,1*	12,82±0,11*	3,5±0,1*	13,6±0,7*	14,7±0,7

**Примечание.** \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

**Таблица 3.** Влияние ПК-66 и семакса на показатели окислительных процессов в мозге крыс при ХИС

Группы животных	Малат, мкм/г ткани	Изоцитрат, мкм/г ткани	Лактат, мкм/г ткани	СДГ, мкм/мг /мин	Цитохром-С-оксидаза, мкм/мг/мин
Интактная	0,38±0,02	0,46±0,03	2,6±0,10	5,77±0,12	11,8±0,11
ХИС (контроль)	0,20±0,01	0,24±0,02	4,7±0,11	2,64±0,11	8,7±0,08
ХИС + семакс	0,27±0,01	0,37±0,01*	2,72±0,11*	4,42±0,09*	10,8±0,07*
ХИС + ПК-66	0,4±0,02*°	0,38±0,01*	2,68±0,1*	6,12±0,1*°	10,0±0,09*

**Примечание.** \* -  $p < 0,05$  по отношению к контролю; ° -  $p < 0,05$  по отношению к семаксу.

Подобные изменения состояния ГАМК-ергической системы при ХИС, расценивают как компенсаторную активацию дополнительного шунта образования энергии в условиях торможения цикла Кребса. Так, торможение окисления  $\alpha$ - кетоглутарата, приводит к активации ГДК и превращению глутамата в ГАМК, а затем при активации ГАМК-Т - в янтарный полуальдегид, который,

превращаясь, в сукцинат - окисляется в цикле Кребса [15,17]. Однако выявленное нами в условиях ХИС снижение активности СДГ и уровня изоцитрата, свидетельствует об определенном торможении сукцинатоксидазного пути поставки протонов в дыхательную цепь и, как следствие, невозможности полноценного использования сукцината, образующегося в шунте Робертса. По всей видимости, в условиях ХИС, только часть янтарного полуальдегида, образующегося из ГАМК, идет на образование энергии, остальное количество превращается в ГОМК ( $\gamma$ -оксималяную кислоту), которая обладает более сильным тормозным действием, чем ГАМК и глицин, дефицит которого мы выявили, и способна ограничивать возбуждение стресс-реализующих систем [5, 11, 13].

Таким образом, в процессе ХИС наблюдается торможение окислительной продукции энергии, активация компенсаторных путей образования АТФ – гликолиза и шунта Робертса, которые, однако, не обеспечивают полностью потребность мозга в энергии и вызывают развитие лактат-ацидоза и дефицит тормозных аминокислот - ГАМК и глицина.

Назначение животным с ХИС соединения ПК-66 способствовало значительной активации окислительной продукции энергии на дикарбонном участке цикла Кребса. Об этом свидетельствовало повышение уровня малата на 100 % и повышение активности СДГ на 131,8 %. При этом наблюдалось повышение активности цитохром-С-оксидазы на 15 % и уровня изоцитрата - на 58,3 %, что обеспечивало повышение продукции АТФ на 53,3 %, на фоне повышения уровня АДФ на 20 %, и снижение уровня АМФ - на 33,3 %.

ПК-66, уменьшая активность анаэробного гликолиза (уровень лактата снижался на 42,3 %), также снижал «расходование» тормозных аминокислот в компенсаторном и энергетически менее выгодном шунте Робертса. Так, при введении ПК - 66 уровень глутамата повышался на 113,4 %, ГАМК - на 160 %, глицина - на 42,8 %, уменьшалась активность ГДК на 25,0 %, ГАМК-Т - на 30 %. Увеличение уровня тормозных аминокислот под действием ПК-66, по всей видимости, способствовало активации стресс-лимитирующих систем мозга и, тем самым, усиливало суммарное нейропротективное действие препарата.

Семакс также оказывал позитивное действие на окислительный метаболизм мозга в условиях ХИС, что выражалось повышением уровня АТФ и АДФ на 37,7 % и 14,2 % соответственно. Семакс, как и ПК-66, уменьшал активность анаэробного гликолиза (уровень лактата снижался на 42,1 %), увеличивал окислительную продукцию энергии за счет нормализации цикла Кребса, но его действие оказалось менее выраженным, чем у ПК-66. Так, уровень малата и изоцитрата повышался на 35 % и 54 % соответственно, а активность СДГ на 67,4 %, цитохром-С-оксидазы на – 14 %. По всей видимости, семакс увеличивал образование АТФ за счет интенсификации трикарбонного участка цикла Кребса, а также дыхательной цепи. Введение семакса не приводило к полному восстановлению глутамата в тканях мозга. Этот факт можно объяснить тем, что глутамат частично используется в энергетическом обмене через превращение в  $\alpha$ -кетоглутарат [13, 17]. При этом семакс повышал уровень ГАМК в тканях мозга на 140 %, уменьшая его использование в шунте Робертса, а так же увеличивал уровень глицина на 22,4 %. Таким образом, семакс и ПК-66 оказывают выраженное метаболитотропное действие, имеющее церебропротективную направленность.

Основу повреждающего действия стресса составляют патобиохимические реакции свободно-радикального окисления, энергодефицит, дефицит интермедиатов ГАМК-ергической системы и тормозных аминокислот, представляющие собой потенциальную мишень для фармакокоррекции. Коррекция свободно-радикального окисления, приводит к торможению окислительной модификации и инактивации белковых макромолекул - ключевых ферментов биоэнергетических процессов нейрона, гиперполяризации мембран митохондрий, нарушению тиосульфидной системы механизмов red-ox – регуляции, окислительной модификации нуклеиновых кислот, тем самым предотвращая торможение экспрессии генов, ответственных за синтез ряда ферментов окислительного метаболизма [5-8, 10, 11, 13, 17].

Коррекция нарушений окислительного метаболизма в условиях стресса повышает активность собственных биоэнергетических процессов, за счет использования дополнительных шунтов энергопродукции (малат-аспартатный, шунт Робертса,  $\alpha$ -глицерофосфатный), интенсификации аэробных реакций окисления субстрата [11, 17].

Соответствующее применение в условиях стрессорного повреждения мозга антиоксидантов, метаболитотропов, энерготропов, активаторов стресс-лимитирующих систем приводит к ограничению свободно - радикального окисления, снижению окислительной деструкции макромолекул,

нормализации метаболических процессов мозговой ткани и к снижению выраженности постстрессорного когнитивного дефицита [13, 17].

Механизм церебропротективного действия семакса обусловлен его антиоксидантным действием, реализующимся за счет транскрипции гена, кодирующего одну из изоформ супероксиддисмутазы [10], а также за счет снижения гиперпродукции NO и образования пероксинитрита [11]. Семакс обладает ярко выраженным ноотропным эффектом, увеличивает адаптационные возможности мозга, повышая его устойчивость к стрессорным воздействиям, ишемии и гипоксии [6, 10]. Семакс увеличивает энергетический потенциал нейрона за счет интенсификации аэробной продукции АТФ, снижает образование лактат-ацидоза [5, 6]. Помимо этого, в условиях ишемии, семакс способен увеличивать образование АТФ за счет интенсификации трикарбонового участка цикла Кребса и дополнительного использования глутамата [3, 6], а также повышать в тканях мозга содержание глицина и ГАМК, тем самым, ограничивая возбуждение стресс-реализующих систем.

Эффективность производного хиназолина ПК-66 в условиях ХИС обусловлено, по-видимому, прямым взаимодействием с АФК (супероксидадикалом и пероксинитритом) [3, 5], а также ингибирующим влиянием на окислительную модификацию белка, способностью снижать гиперпродукцию NO [3], и как следствие, оказывать стабилизирующее влияние на митохондриальную дисфункцию. Соединение ПК-66 уменьшает явление энергодефицита в условиях ХИС за счет интенсификации окислительной продукции АТФ, усиливая активность дикарбонового участка цикла Кребса. Соединение ПК-66 уменьшает дефицит тормозных аминокислот в головном мозге стрессированных крыс, тем самым, усиливая воздействие стресс-лимитирующих систем [11, 12, 17].

**Выводы.** 1. Хронический иммобилизационный стресс приводит к стойким нарушениям окислительного метаболизма мозговой ткани - энергодефициту, торможению цикла Кребса, активации гликолиза, активации ГАМК-ергической системы и истощению ее интермедиатов и тормозных аминокислот. 2. Курсовое назначение животным с хроническим стрессом семакса (300 мг/кг) и производного хиназолина ПК-66 (10 мг/кг) уменьшало степень выраженности энергодефицита за счет интенсификации энергетически более выгодного окисления в цикле Кребса; снижало «расходование» интермедиатов ГАМК-шунта в энергообмене, повышало концентрацию тормозных аминокислот; снижало активность анаэробного гликолиза и развитие лактат-ацидоза. 3. Сравнительный анализ фармакологического действия производного хиназолина (ПК-66) и семакса позволило определить ПК-66 как наиболее перспективный церебропротектор с противострессорным действием.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Беленичев И.Ф., Дунаев В.В., Бухтиярова Н.В. Коррекция свободнорадикальных процессов антиоксидантом «Нитрокол» // Офтальмол. журн. – 2002. - № 2. – С. 42-46
2. Беленичев И.Ф., Дунаев В.В., Коваленко С.Н. Изучение возможных механизмов антиоксидантного действия потенциального препарата «Нитрокол» и роли в этом оксида азота при моделировании ишемии и реперфузии головного мозга // Архив клин. и экспер. мед. - 2002. - № 3 – С. 299-303
3. Беленичев И.Ф., Коваленко С.Н., Бухтиярова Н.В. Производные хиназолина – перспективные нейропротективные средства с антиоксидантным механизмом действия // Запорожский медицинский журнал. - 2004. - № 1. - С. 1-7
4. Воронина Т.А. Гипоксия и память. Особенности эффектов и применения ноотропных препаратов // Вестн. РАМН. - 2000. - № 9 - С. 27-33.
5. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга - М.: Медицина, 2001. – 328 с.
6. Галенко-Ярошевский П.А., Чекман И.С., Горчакова Н.А. Очерки фармакологии средств метаболической терапии – М.: Медицина, 2001. – 240 с.
7. Меерсон Ф.З. Физиология адаптационных процессов – М.: Наука, 1986. – 670с.
8. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца – М.: Медицина, 1984. – 272 с.
9. Лаврецкая Е.Ф. Фармакологическая регуляция умственных процессов – М.: Медицина, 1995. – 248с.
10. Каплан А.Я., Каменский А.А., Ашмарин И.П. Антиишемические свойства нейропептида семакс – М.: Медицина, 1999. – 278с.
11. Ковалев Г.В. Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот / В кн.: Труды Волгоградского мед. ин-та. – Волгоград, 1995. – 37(5). – С. 295-300.
12. Съгинский И.А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности центральной нервной системы – М.: Наука, 1992. – 271с.
13. Пикамилон – новый цереброваскулярный и ноотропный препарат / Под. ред. Р.С. Мирзояна – М.: ВНИИСЭНТИ, 1989. – Ч. 1 – 154 с.
14. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 278 с.

15. Розанов В.А. Влияние пиридоксальфосфата и производных пантотена на  $\gamma$ -аминобутиратный шунт в головном мозге мышей // Вопр. мед. химии. – 1988. - № 1 – С. 42-46
16. Шашунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии – М.: Мир, 1980. – Т. 2 – 295 с.
17. Якушев В.С. Принципы метаболической коррекции и регуляции энергетического обмена мозга. – Запорожье, 1987. – 29 с.

**Abstract.** *In the article the data about a condition of brain tissue oxidizing metabolism at rats, which are exposed to chronic immobilizing stress are considered. Being based on own experimental data given by authors it is shown, that chronic immobilizing stress is accompanied by development of energetic deficiency, and also activation of glycolis, GAOA-ergic system. Preventive course of the semax and «PC-66» reduced the degree of energetic deficiency and activity anaerobic glycolysis. «PC-66» during the influence on the studied parameters statistically exceeded the parameters of semax effects.*

**Keywords:** *chinasolinum, semax, energetic metabolism, brain, model, immobilizing stress.*

**Резюме.** *У статті розглянуті дані про стан окислювального метаболізму мозкової тканини у щурів, що зазнали хронічного іммобілізаційного стресу. Основуючись на особистих експериментальних даних, авторами показано, що хронічний іммобілізаційний стрес супроводжується розвитком енергодефіциту, а також активацією гліколізу, ГАМК-ергічної системи. Курсове призначення семаксу та ПК-66 знижувало ступінь енергодефіциту, зменшувало активність анаеробного гліколізу. ПК-66 за своїм впливом на досліджувані показники статистично вірогідно перевищувало показники ефектів семаксу.*

**Ключові слова:** *хіназолін, семакс, енергетичний метаболізм, головний мозок, модель, іммобілізаційний стрес.*

*Надійшла 16.03. 2006 р.*