

# ВПЛИВ СПІРОЦИКЛІЧНОГО ПОХІДНОГО ОКСІНДОЛУ НА ПОКАЗНИКИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ В УМОВАХ ГІПОКСИЧНОЇ ТА НЕГІПОКСИЧНОЇ ПАТОЛОГІЇ

*Н.А.Цубанова, С.Ю.Штриголь\*, Т.В.Горбач\*\**

Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації  
Національного фармацевтичного університету  
Національний фармацевтичний університет\*  
Харківський національний медичний університет\*\*

*Ключові слова: спіроциклічне похідне оксіндолу; енергетичний обмін; мексидол; метаболічна дія*

*Наведені результати впливу спіроциклічного похідного оксіндолу в дозі 5 мг/кг на церебральний енергетичний обмін в умовах експериментальної патології гіпоксичного та негіпоксичного генезу. Встановлено, що нова сполука запобігає розвитку енергодефіциту на тлі обох модельних патологій. Сполука 77 збільшує рівень АТФ, зменшує накопичення АДФ, нормалізує активність ферментів дихального ланцюга. Відновлення енергодефіциту за умов введення спіроциклічного похідного оксіндолу не залежить від генезу патології. Досліджувана сполука за впливом на показники енергетичного обміну вірогідно перевищує активність препарату порівняння мексидолу в дозі 100 мг/кг. Отримані результати свідчать про доцільність подальшого фармакологічного вивчення нової субстанції з метою розробки нового антигіпоксичного препарату метаболічної дії.*

Порушення енергетичного обміну лежать в основі більшості патологічних станів. Вони реалізуються на молекулярному рівні. Відбувається пошкодження цитоплазматичних включень – мембран мітохондрій, лізосом, ендоплазматичного ретикулуму тощо [7]. Частіше за все ці ушкодження індуковані активацією окиснення, дією токсинів, а також порушенням нервової та гуморальної регуляції. На організмі і тканинному рівні наслідком зсуву енергетичного метаболізму є зміни специфічної функції відповідних органів та систем [4]. За інтенсивністю енергетичних процесів провідне місце в організмі займає мозок, причому найбільша швидкість метаболізму характерна для кори великих півкуль, найменша – для спинного мозку. Особливістю цере-

брального метаболізму є те, що він практично не має запасу енергетичних субстратів та потребує їх постійного постачання через мозковий кровообіг [13]. Крім того, енергетичні потреби мозку задовольняються переважно завдяки катаболізму глюкози (85-90%). Основними ланками у генезі переважної більшості порушень церебрального енергетичного метаболізму вважають гіпоксично-ішемічні ураження (наприклад, внаслідок недостатності мозкового кровообігу) та енергетичні зсуви, пов'язані з індукованими стресом змінами метаболізму.

Актуальним є пошук нових препаратів, здатних нормалізувати церебральний енергетичний дисбаланс за умов патологій різного генезу.

Перспективним в аспекті пошуку нових антигіпоксичних ме-

таболічної дії є 4,3'-спіро[[2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано [3,2-с]хромен-5-он]-5-метил-2'-оксіндолу], у подальшому сполука 77, синтезована у НФаУ к.ф.н. Редькіним Р.Г. та проф. Шемчуком Л.А., стосовно якої у попередніх дослідженнях доведена значна антигіпоксична активність [5].

Метою даної роботи було вивчення впливу нової сполуки на енергетичний обмін в умовах експериментальної патології гіпоксичного та негіпоксичного генезу для дослідження можливої метаболічної дії.

## Матеріали та методи

На першому етапі експерименту досліджували біохімічні показники на тлі негіпоксичної патології. Модель нейрогенного стресу [3] відтворювали таким чином: тварин групами по 5 особин поміщали на 1 год до камери розміром 50×50×35 см, де їх піддавали впливу стресогенних чинників (світло електролампи потужністю 300 Вт, звук електричного дзвінка інтенсивністю 60 дБ, електричний струм порогової величини 5-6 мА).

**Н.А.Цубанова** – канд. фармацевт. наук, доцент кафедри загальної фармації та безпеки ліків Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

**С.Ю.Штриголь** – доктор мед. наук, професор, завідувач кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

**Т.В.Горбач** – канд. біол. наук, доцент кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету

Таблиця 1

**Вплив сполуки 77 та мексидолу на енергетичний обмін мозку щурів на тлі нейрогенного стресу, n=6 у кожній групі**

| Показники                                     | Групи              |                      |                     |                     |
|---|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|   | інтактний контроль | контрольна патологія | мексидол, 100 мг/кг | сполука 77, 5 мг/кг |
| АТФ, мкмоль/г                                 | 2,75±0,09          | 1,49±0,04***         | 1,96±0,04*****      | 2,34±0,07***\$      |
| АДФ, мкмоль/г                                 | 0,280±0,01         | 0,419±0,02**         | 0,327±0,01**        | 0,303±0,005**\$     |
| Цитратсинтаза, нмоль/хв×мг білка              | 4,51±0,14          | 2,74±0,21***         | 3,17±0,12***        | 4,12±0,09**\$       |
| Сукцинатдегідрогеназа, нмоль/хв×мг білка      | 6,95±0,23          | 2,98±0,11***         | 4,63±0,17*****      | 6,48±0,028***\$     |
| Піруватдегідрогеназа, мкмоль НАДН/хв×мг білка | 28,5±0,96          | 17,1±0,39***         | 19,8±0,36****       | 23,6±0,49*****\$    |

Примітки:

- 1) достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001;
- 2) достовірні відмінності з показниками контрольної патології # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001;
- 3) достовірні відмінності з групою мексидолу \$ – p<0,05; \$\$ – p<0,01.

Тварини були розподілені на групи: 1) інтактний контроль, n=6; 2) контрольна патологія (КП), n=6; 3) КП + внутрішньошлункове введення сполуки 77 у дозі 5 мг/кг протягом 3-х діб, востаннє за 40 хв до проведення експерименту, n=6; 4) КП + введення препарату порівняння мексидолу виробництва ВАТ «Мирфарм», Росія у дозі 100 мг/кг за аналогічною схемою, n=6.

Для оцінки участі сполуки 77 в енергетичному обміні досліджували вміст макроергічних фосфатів – АТФ, АДФ – у тканині головного мозку за допомогою наборів реактивів фірми «Мангайм» (Німеччина). Для дослідження вмісту макроергів використовували метод Лампрехта і Тротшоляда [1, 6]. Принцип методу полягає в тому, що АТФ, який міститься в пробі, у присутності гексокінази фосфорилує глюкозу. Глюкозо-6-фосфат, який утворюється при цьому, в свою чергу, є субстратом для глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназної реакції.

*Визначення активності цитратсинтази.* Цитратсинтаза як один із ключових ферментів циклу Кребса каталізує реакцію конденсації ацетил-КоА та оксалоацетової кислоти з утворенням лимонної кислоти,

реакція яка є першим ступенем циклу трикарбонових кислот, біосинтезу жирних кислот. Для визначення цитратсинтазної активності використовували метод, що ґрунтується на зміні оптичної щільності (визначали при довжині хвилі 340 нм) середовища від додавання малату, який окиснюється екзогенною малатдегідрогеназою до оксалоацетату, а останній вступає до реакції конденсації із ацетил-КоА [1, 6].

*Визначення активності піруватдегідрогенази.* Піруватдегідрогеназа – мітохондріальна ферментативна система, що бере участь у метаболізмі піровиноградної кислоти. Принцип методу визначення ферментативної активності: піруватдегідрогеназа здійснює окисне декарбокислювання пірувату з одночасним відновленням НАД. Швидкість накопичення відновленої форми НАД, яка є показником ферментативної активності піруватдегідрогенази, визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм [1, 6].

*Визначення активності сукцинатдегідрогенази.* Сукцинатдегідрогеназа – флавопротеїд, у молекулі якого в якості кофериенту знаходиться ковалентно зв'язаний флавінаденіндинуклеотид (ФАД). Цей кофермент

діє як акцептор Н<sub>2</sub>. Для визначення сукцинатдегідрогеназної активності використовували метод, що ґрунтується на зміні оптичної щільності, яку визначали при довжині хвилі 600 нм 2,6-дихлорофеномендофенолу (ДХФІФ), який відновлюється в присутності феназинметасульфату (ФМС) при ферментативному окисненні сукцинату [1, 6].

Другий етап експерименту було спрямовано на вивчення впливу сполуки 77 на ті ж показники енергетичного обміну в умовах гіпоксичної патології. Гостру нормобаричну гіпоксію викликали вміщенням тварин до герметичної камери об'ємом 500 мл на 10 хв. Розподіл тварин за групами та біохімічні показники, що досліджували, були аналогічні першому етапу.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistika 6.0 з використанням критерію Стьюдента.

### **Результати та їх обговорення**

За умов нейрогенного стресу відбувається значне порушення різних ланок енергетичного обміну (табл. 1).

Відомо, що ферменти дихального ланцюга і дегідрогенази

Таблиця 2

**Вплив сполуки 77 та мексидолу на енергетичний обмін мозку щурів  
на тлі гострої гіпоксії, n=6 у кожній групі**

| Показники                                     | Групи              |                      |                     |                     |
|---|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|   | інтактний контроль | контрольна патологія | мексидол, 100 мг/кг | сполука 77, 5 мг/кг |
| АТФ, мкмоль/г                                 | 2,96±0,06          | 1,21±0,04***         | 2,20±0,09****#      | 2,59±0,05****#      |
| АДФ, мкмоль/г                                 | 0,264±0,005        | 0,330±0,007***       | 0,304±0,006****#    | 0,281±0,004***#     |
| Цитратсинтаза, нмоль/хв×мг білка              | 4,78±0,08          | 2,63±0,10***         | 3,57±0,13****#      | 4,12±0,09****#      |
| Сукцинатдегідрогеназа, нмоль/хв×мг білка      | 7,27±0,29          | 2,74±0,12***         | 4,90±0,24****#      | 6,69±0,18***#       |
| Піруватдегідрогеназа, мкмоль НАДН/хв×мг білка | 29,1±0,64          | 15,9±0,29***         | 21,7±0,54****#      | 27,0±0,43****#      |

Примітки:

- 1) достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001;
- 2) достовірні відмінності з показниками контрольної патології # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001;
- 3) достовірні відмінності з групою мексидолу \$ – p<0,05; \$\$ – p<0,01.

циклу Кребса багато в чому визначають інтенсивність аеробного окиснення – основного шляху утворення енергії [1]. У зв'язку з цим було досліджено динаміку зсувів вмісту АТФ та її метаболіту АДФ. У групи КП відбувається вірогідне зниження у 1,8 рази вмісту АТФ відносно інтактного контролю та одночасне збільшення рівня АТФ у 1,5 рази. Порушення ферментативної активності енергетичних процесів верифіковано за достовірним зниженням активності цитратсинтази – у 1,6 рази, сукцинатдегідрогенази – у 2,3 рази та піруватдегідрогенази – у 1,7 рази. Отримані результати підтверджуються літературними даними – за умов нейрогенного стресу, депресії відбувається значне зниження енергетичного метаболізму головного мозку, на 20-30% знижується утилізація глюкози та вміст АТФ, що, в свою чергу, призводить до збільшення нейрональної дисфункції та погіршення стану хворого [2, 12].

Встановлена позитивна дія мексидолу на церебральний метаболізм в умовах нейрогенного стресу підтверджена багатовислідженнями та пояснює його метаболічну дію [2, 9].

Введення сполуки 77 збільшує вміст АТФ на 57% відносно групи КП на відміну від 19% на тлі мексидолу. Встановлено, що сполука 77 відновлює активність цитратсинтази на 50%, сукцинатдегідрогенази – на 117%, піруватдегідрогенази – на 38% відносно групи КП, для мексидолу зміна показників становила 16%, 55% та 16% відповідно. Отримані результати свідчать, що метаболічна дія сполуки 77 вірогідно ефективніша, ніж у препарату порівняння мексидолу.

Наступний етап дослідження спрямовано на з'ясування впливу сполуки 77 на енергетичний метаболізм за умов гострої гіпоксії. Гіпоксія призводить до зниження аеробного обміну глюкози. Анаеробний метаболізм глюкози компенсаторно посилюється, внаслідок чого накопичується лактат та знижується інтранейрональне значення рН. Ацидоз індукує вторинні порушення роботи дихального ланцюга мітохондрій. При цьому збільшується синдром пероксидації, відбувається пошкодження клітин та наростає енергетичний дефіцит [8, 10].

Гостра гіпоксія характеризується значним порушенням церебрального енергообміну, який

верифіковано за вірогідним зниженням вмісту АТФ, збільшенням АДФ та суттєвою інактивністю ферментативної ланки енергетичних процесів – зниження активності цитратсинтази, сукцинатдегідрогенази та піруватдегідрогенази (табл. 2).

Введення сполуки 77 значно покращувало енергетичний обмін мозку на тлі гострої гіпоксії. Встановлено вірогідне підвищення вмісту АТФ (на 115% відносно групи КП), для мексидолу зміна цього показника становила 83%. Що стосується активності ферментів енергетичного метаболізму, то сполука 77 достовірно відновлювала її дію. Це свідчить про потужну здатність нової сполуки попереджувати розвиток енергетичного дефіциту. Енергозберігаюча активність мексидолу вірогідно поступається дії нової сполуки.

#### ВИСНОВКИ

На підставі отриманих даних можна зробити висновок про те, що спіроциклічне похідне оксіндолу в дозі 5 мг/кг відновлює енергетичний обмін головного мозку за умов патологій гіпоксичного та негіпоксичного генезу. Потужна енергозберігаюча дія нової сполуки вірогідно перевищує таку у препарату порівняння мексидолу в дозі 100 мг/кг.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бойків Д.П., Бондарчук Т.І., Іванкув О.Л. та ін. Клінічна біохімія / За ред. О.Я.Склярова. – К.: Медицина, 2006. – 432 с.
2. Воронина Т.М. // Мед. вестник. – 2009. – № 6 (475). – С. 12-16.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / За ред. О.В.Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
4. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Молекулярная фармакология антигипоксантов. – С.-Пб.: ООО «Изд-во Н-Л», 2004. – 368 с.
5. Пат. 87952 Україна, МПК С 07 D 209/04, 209/96, 311/96, 405/02, 491/20, А 61 К 31/33, 31/404, 31/436, 31/437, 31/438 4,3'-Спіро[[2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он]-5-метил-2'-оксіндол], який проявляє антигипоксантну активність / Р.Г.Редькін, Н.А.Цубанова, В.П.Черних; заявник та патентовласник НФаУ. – № заявки 200815044. Заявл.: 26.12.2008. Опубл.: 25.08.2009. – Бюл. №16.
6. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Учеб. пособие. – Л., 1982. – С. 272.
7. Bright R., Steinberg G.K., Mochly-Rosen D. // Brain Res. – 2007. – Vol. 1144. – P. 146-155.
8. Chen B., Friedman B., Cheng Q. et al. // Stroke. – 2009. – Vol. 40. – P. 666-674.
9. Innamorato N., Lastres-Becker I., Cuadrado A. // Curr. Opin. Neurol. – 2009. – №22. – P. 308-314.
10. Kelly B.M., Pangilinan Jr.P.H., Rodriguez G.M. // Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am. – 2007. – №18. – P. 631-650.
11. Owen L., Sunram-Lea S.I. // Nutrients. – 2011. – №3 (8). – P. 735-755.
12. Schweiger U., Greggersen W., Rudolf S. et al. // Psychosom. Med. – №70 (2). – P. 170-176.
13. Stroke G.A. Donnan, Fisher M., Macleod M. et al. // Lancet. – 2009. – Vol. 371. – P. 1612-1623.

Адреса для листування: 61001, м. Харків,  
пл. Повстання, 17. Тел. (57) 706-30-69.  
Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації  
Національного фармацевтичного університету

Надійшла до редакції 04.09.2012 р.