

ancient-medicine-20110203-1affk.html. Accessed at 9 February 2011.

5. *Алекперли Ф. У.* Тысяча и один секрет Востока / Ф. У. Алекперли. – Баку : Нурлан, 2008. – Т. 1. – С. 3-5.

6. *Алекперли Ф. У.* Тысяча и один секрет Востока / Ф. У. Алекперли. – Баку : Нурлан, 2008. – Т. 2. – С. 38-50.

7. *Фон Грюнебаум Г. Э.* Основные черты арабо-мусульманской культуры / Г. Э. фон Грюнебаум. – М. : Наука, 1986. – С. 32–65.

8. *Джафарзаде И. М.* Элементы археологической культуры древней Мугани / И. М. Джафарзаде // Известия АН Азерб. ССР. – 1949. – № 9. – С. 39–44.

9. *Alakbarli F.* Medieval Manuscripts. History of Medicine. Medicinal Plants / F. Alakbarli. – Baku : Nurlan, 2006. – 125 p.

10. *Mikayilova Ş.* Qədim və orta əsrlərdə Azərbaycanca dərmanşünaslıq

/ Ş. Mikayilova. – Bakı : Azərbaycan ensiklopediyası “NPB”, 2000. – С. 25.

11. *Рзаев Н. И.* Искусство Кавказской Албании. IV в. до н. э. – VII в. н. э. / Н. И. Рзаев. – Баку : Элм, 1976. – С. 178–179.

12. *Hacıyev Q.* Şabrandan tapılmış bir şüşə qab haqqında / Q. Hacıyev, Z. Əfəndiyeva // Az. SSR EA Məruzələri. – 1987. – XLIII cild, N 11. – S. 85–87.

13. *Ашурбейли С.* История города Баку. Период средневековья / С. Ашурбейли. – Баку : Азербайджанское государственное издательско-полиграфическое объединение, 1992. – С. 27.

14. *Джидди Г. А.* Средневековый город Шемаха IX–XVII века / Г. А. Джидди. – Баку : Элм, 1981. – С. 174.

15. *Средневековые азербайджанские трактаты по медицине.* Мухам-

мед Юсиф Ширвани. Тиббнаме (Медицинская Книга). Мухаммед Мумин Тухфат аль-Муминин (Дары Мумина) / [Предисл., пер. со староазерб., коммент., указ. рус. и лат. названий растений А. Фарзалиева, Ф. Алекперова]. – СПб. : Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2002. – С. 5-12.

16. *Капранов В.* Мудрость веков / В. Капранов, Р. Хашим. – Баку : Язычы, 1992. – С. 31.

17. Там же. – С. 32.

18. *Мир Мухаммад Мумин* «Тухфат ал-Муминин». – Рукопись ИР НАНА, 1245 г. хиджры, 540 С., шифр: М 243/3747. – С. 26.

19. Там же. – С. 69.

20. Там же. – С. 33.

21. Там же. – С. 52.

22. Там же. – С. 132.

23. Там же. – С. 325.

24. Там же. – С. 460.

УДК 612.825:618.839

І. Ф. Бєленічев, С. В. Павлов, І. А. Мазур, А. В. Абрамов

## ДЕЯКІ МЕХАНІЗМИ ЕНДОТЕЛІОПРОТЕКТИВНОЇ ДІЇ НОВОГО ОРИГІНАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ЛІЗИНІЮ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІШЕМІЧНОГО ПОШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Запорізький державний медичний університет,  
НВО «Фарматрон»

Останнім часом прогресивно збільшується кількість мозкових інсультів, у першу чергу, за рахунок ішемічних порушень мозкового кровообігу. В найближче десятиліття експерти ВООЗ прогнозують зростання випадків ішемічних інсультів, що зумовлено збільшенням кількості осіб літнього віку і значним поширенням таких чинників ризику, як артеріальна гіпертензія, цукровий діабет, ожиріння, паління, алкоголізм тощо [1; 2]. Проблеми мозкових інсультів актуальні і в Україні, близько 100–120 тис. людей щороку переносять інсульт [1; 3]. Близько 80 % хворих після ішемічного інсульту стають інвалідами, із них 10 %

потребують постійної допомоги, і лише 10 % ішемічних інсультів закінчуються повним відновленням порушених функцій [3].

Відомо, що у патогенезі серцево-судинних захворювань (інфаркт міокарда, церебральний ішемічний інсульт, атеросклероз, артеріальна гіпертензія, серцева недостатність) головна роль належить ендотеліальній дисфункції (ЕД) [4]. Однією з причин розвитку ЕД є зниження утворення та біодоступності окису азоту при супровідному підвищенні рівня супероксид аніона та продукції вазоконстрикторних факторів, зниженні енергопродукції в ендотеліоцитах [4; 5]. Отже, дис-

функція ендотелію є проявом дисбалансу між медіаторами, які забезпечують у нормі оптимальний перебіг усіх ендотеліозалежних процесів. Таким чином, пошук можливостей цілеспрямованої корекції ЕД є важливим клініко-експериментальним завданням [6]. Слід зазначити, що сьогодні немає лікарських засобів для специфічної корекції ЕД. З метою фармакокорекції порушень енергетичного метаболізму, оксидативного стресу, гіперліпідемії, синтезу оксиду азоту при ішемії головного мозку та інших серцево-судинних захворюваннях застосовують метаболітотропні препарати — мілдронат, триметазидин, пірацетам, мекси-



дол [5; 6]. Однак відсутність у цих препаратів ендотеліотропних властивостей і досить висока антиоксидантна та протиішемічна активність спонукають до пошуку нових, більш ефективних препаратів. Сучасні наукові дослідження ендотеліопротективних засобів доводять перспективність застосування препаратів лізину. Показано вплив L-лізину на деякі нейротрансмітерні системи. Так, L-лізину притаманні властивості деприватора ЦНС із протисудомною дією, що здійснюється через посилення афінності ГАМК-бензодіазепін-рецепторного комплексу [6]. Паралельними дослідженнями встановлена антиоксидантна та протиішемічна активність оригінального препарату «Тіотріазолін» та його властивість утворювати комплекси з NO [6].

Усе вищенаведене є обґрунтуванням для створення принципово нового лікарського засобу оригінальної структури L-лізину 1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату з робочою назвою лізиній.

**Мета** роботи — дослідження ендотеліо- та нейропротективної дії лізину в умовах моделювання ішемічного ушкодження головного мозку.

#### **Матеріали та методи дослідження**

Експериментальні досліді проведені на 50 самцях щурів лінії Вістар масою 200–220 г, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України». Тривалість карантину становила 14 діб, протягом яких проводився щодобовий огляд кожної тварини (поведінка та загальний стан) [7]. Перед початком дослідження тварин, які відповідали критеріям включення до експерименту, розподілили на експериментальні групи методом рандомізації. Дослідних тварин утримували на однаковому раціоні у звичайних умовах віварію згідно з правилами Європейської конвенції із захисту

хребетних тварин, що використовуються в наукових дослідженнях (Страсбург, 1986) [7].

Ішемію головного мозку моделювали шляхом оклюзії загальної сонної артерії. Операцію проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг), який вводили внутрішньочеревинно [8]. Досліджувані препарати вводили одразу після виходу тварин з наркозу протягом 21 доби: лізиній — дозою 50 мг/кг; пірацетам (референс-препарат) — дозою 100 мг/кг. Після закінчення експерименту тварин наркотизували шляхом введення тіопенталу натрію (40 мг/кг) і з черепної коробки вилучали головний мозок.

З метою вивчення ендотеліопротективної активності вказаних препаратів проводили дослідження морфофункціонального стану ендотеліоцитів капілярів IV–V шару кори головного мозку [8]. Гістологічні зрізи депарафінували за стандартною методикою, забарвлювали галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсом для специфічного виявлення РНК. Для ендотеліальних клітин визначали такі показники:

- площа ядра;
- середній діаметр ядра;
- концентрація РНК;
- густина ядер ендотеліоцитів як кількість клітин на 1 мм<sup>2</sup>.

Для визначення ендотеліоцитів, що проліферують, проводили гістохімічне визначення BrDu-позитивних ендотеліоцитів, для чого зрізи інкубували з моноклональними антитілами миші до 5-бром-2-дезоксиридину (anti-BrDu, клон BU-33) виробництва Sigma-Aldrich (кат. № B8434). Після інкубації зрізи промивали фосфатним буфером, після чого проводили інкубацію з вторинними антитілами вівці до F<sub>(AB)<sub>2</sub></sub> фрагмента IgG миші, кон'югованими флуоресцентним барвником FITC виробництва Sigma-Aldrich (кат. № F2266) [8].

Аналіз гістологічних зрізів проводили на мікроскопі Axio-

skop (Zeiss, Німеччина) в ультрафіолетовому світлі. Для отримання зображення ядер ендотеліоцитів використовували високоемісійний фільтр 38HE фірми Zeiss (кат. № 489038–0000) з діапазоном збудження 450–490 нм, діапазоном емісії 500–550 нм, а також об'єктив із широкою апертурою Fluor 40x/1.30 Oil фірми Zeiss (кат. № 440260–9900). Зображення за допомогою 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили у комп'ютерну систему аналізу зображення (Kontron Elektronik, Німеччина) та обробляли за допомогою макропрограми, розробленої у спеціалізованому середовищі програмування Vidas-2,5 (Kontron Elektronik, Німеччина) [8].

Для визначення активності ендотеліального фактора росту (vascular endothelial growth factor — VEGF) застосовували методику ідентифікації, описану вище, але як первинні антитіла використовували IGG1 миші до ендотеліального фактора росту щурів/людини (клон CH-10) виробництва Chemikon (кат. № MAB1665). При цьому визначали концентрацію VEGF у тканині (одиниці оптичної густини — E<sub>1φ</sub>), яку розраховували як логарифм співвідношення статистично значущої інтенсивності флуоресценції до флуоресценції міжклітинної речовини [8].

Статистичну обробку результатів проводили методами математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм «Біостатистика для Windows, версія 4.03» і «Microsoft Excel 2002». Для кожної досліджуваної ознаки визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної помилки середнього арифметичного (m). Нормальність розподілу перевіряли за використанням тесту Колмогорова — Смирнова. За умови відповідності нормальності розподілу вірогідність отриманих розходжень порівнюваних



**Вплив лізинію та референт-препарату  
на характеристику ендотеліоцитів капілярів  
IV–V шару кори головного мозку щурів  
із церебральною ішемією залежно від терміну експерименту,  
M±m, n=10**

Експериментальні групи тварин	Щільність ядер на 1 мм <sup>2</sup> кори	Площа ядер, мкм <sup>2</sup>	Діаметр ядер, мкм <sup>2</sup>	Концентрація РНК в ядрі, E <sub>оп</sub>
Інтактна	861±14	8,34 ±0,07	2,77±0,01	0,293±0,002
Ішемія				
4-та доба (контроль)	617±11	9,18±0,06	3,07±0,01	0,212±0,001
4-та доба + лізиній	727±10*	9,87±0,03*	3,11±0,01	0,311±0,001*
21-ша доба	631±15	9,11±0,03	3,05±0,01	0,278±0,001
21-ша доба + лізиній	761±17*	8,27±0,03*	2,93±0,01*	0,297±0,002*
4-та доба + пірацетам	618±15	9,20±0,07	3,06±0,01	0,217±0,001
21-ша доба + пірацетам	634±15	9,05±0,05	3,02±0,01	0,273±0,001

*Примітка.* \* —  $p \leq 0,05$  по відношенню до контрольної групи тварин.

величин оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідність відмінностей відносних величин оцінювали із застосуванням критерію  $\chi^2$ . Статистично значущими вважали відмінності з рівнем значущості більше 95 % ( $p < 0,05$ ) [9].

### Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження судинного компонента кори головного мозку показало, що на 4-ту добу після ішемії спостерігається зниження щільності ядер ендотеліоцитів капілярів більш ніж на 32,1 % на одиницю площі зрізу кори головного мозку по відношенню до інтактних тварин. Це характеризує процеси ішемізації кори мозку, закриття капілярів і зменшення кількості тих, які функціонують. У подальшому на 21-шу добу за рахунок ревазуляризації ішемізованих відділів мозку спостерігається часткове відновлення капілярної сітки, а щільність ядер ендотеліоцитів лише на 9,7 % нижча, ніж у інтактних тварин.

Розвиток ішемії кори супроводжувався падінням концентрації РНК у ядрах ендотеліоцитів капілярів на 15 % порівняно з інтактними тваринами на 4-ту добу після моделювання ішемії та практично повним відновленням пулу РНК на 21-шу добу (табл. 1). Курсове призначення лізинію спричиняло ефект уже на 4-ту добу експерименту, що проявлялося статистично вірогідним збільшенням щільності ядер на одиницю площі зрізу кори, гіпертрофією ядер і збільшенням у них концентрації РНК. Разом із цим, найбільш виражений ефект відмічався після 21-ї доби введення лізинію, що проявлялось у повному відновленні щільності ендотеліоцитів капілярів, а це свідчить про повне відновлення капілярної сітки у корі головного мозку ішемізованих тварин (див. табл. 1).

Слід зазначити, що, хоча в ці терміни зникли явища гіпертрофії ядер ендотеліоцитів, а концентрація РНК була на рівні інтактних щурів, цей факт тільки підтверджує повну ревазуляризацію та компенсацію міцності капілярного кровопостачання кори на тлі введення лізинію. Важливо відмітити, що призначення дослідним тваринам пірацетаму не спричиняло ендотеліотропного ефекту, як видно з табл. 1, показники пірацетаму статистично вірогідно не відрізнялися від показників контрольної групи тварин.

Для більш детальної характеристики процесів ревазуляризації було досліджено ступінь зв'язування фактора росту ендотеліальних судин (VEGF) і характер проліферативної активності ендотелію капілярів. Відомо, що серед факторів, які беруть участь у регуляції ангіогенезу, найважливішими є VEGF та його гомологи [10]. Головним індуктором ангіогенезу є VEGF, що являє собою глікопротеїн, який збільшує судинну проникність, спричинює селективний мітогенний ефект на ендотеліоцити і синтезується

ендотеліальними клітинами за умов гіпоксії [10; 11].

Встановлено, що ішемічне пошкодження мозку призводило до вірогідного збільшення зв'язування VEGF із судинним ендотелієм капілярної сітки кори, що є ранньою відповіддю на церебральну ішемію. Ця відповідь, здійснювана на молекулярному рівні, є одним із перших адаптаційних механізмів головного мозку на ішемію. Призначення лізинію позитивно впливало на цей процес, що позначалося на збільшенні концентрації VEGF більш ніж на 23 % відносно контрольної групи; призначення пірацетаму не давало подібного ефекту.

Моделювання ішемії призводило до пригнічення проліферативної активності судинного ендотелію капілярів кори мозку, незважаючи на приріст концентрації VEGF. Це, на нашу думку, пов'язано з розвитком гіпергомоцистеїнемії, яка, в свою чергу, з одного боку, змінює просторову конформаційність VEGF, з другого — пригнічує шаперонну активність HSP-білків, які захищають VEGF від окисної модифі-



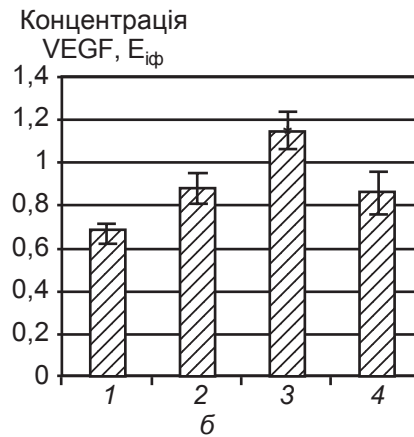


Рис. 1. Вплив досліджуваних препаратів на проліферативну активність судинного ендотелію IV–V шару кори (а) та концентрацію VEGF (б) тварин з експериментальною ішемією на 21-шу добу експерименту: 1 — інтактна; 2 — ішемія, 21-ша доба; 3 — лізиній; 4 — пірацетам; \* — статистична значущість результату ( $p \leq 0,05$ ) відносно ішемії на 21-шу добу

кації, що не дає можливості для реалізації біологічних функцій цього фактора [11; 12]. Водночас призначення лізинію суттєво збільшувало проліферативну активність судинного ендотелію, що проявлялося збільшенням BrDu-позитивних ендотеліоцитів. Препарат порівняння — пірацетам на проліфераційну активність ендотеліоцитів не впливав (рис. 1).

Подібна дія лізинію зумовлена, по-перше, його енергетичними властивостями; по-друге, його значною антиоксидантною активністю, а також здатністю впливати на синтез протективних HSP-білків, що було нами раніше встановлено у досліджах *in vivo* та *in vitro* [6]. За рахунок антиоксидантної активності лізиній зменшує явища гіпергомоцистеїнемії, а також знижує нагромадження окиснених тіолів у головному мозку, що, в свою чергу, запобігає окисненню та зміні активності VEGF. Крім того, антиоксидантна активність лізинію перешкоджає окисній модифікації самих HSP-білків, чим продовжує термін їх функціонування [6; 13; 14]. Відомо, що HSP-білки за умов дефіциту кисню виконують протективну функцію відносно індукційного фактора гіпоксії (HIF), який координує

«запуск» компенсаторних реакцій організму у відповідь на гіпоксію, у тому числі VEGF.

Таким чином, встановлені виражені ендотеліопротективні властивості лізинію зумовлюють перспективність його подальшого дослідження в експерименті і в клінічній неврологічній практиці.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Очерки ангионеврологии* / Н. В. Верещагин, И. В. Ганнушкина, З. А. Суслина [и др.]. — М.: Атмосфера, 2005. — С. 88–107.
2. Зозуля І. С. Гострі порушення мозкового кровообігу як критичні стани в невропатології / І. С. Зозуля, В. І. Боброва // Український неврологічний журнал. — 2006. — № 1. — С. 5–8.
3. Гусев Е. И. Проблема инсульта в России / Е. И. Гусев // Инсульт. — 2003. — № 9. — С. 3–7.
4. Strick A. T. Nitric oxide donor compounds inhibit the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to endothelial cells / A. T. Strick, N. Hogg, J. P. Thomas // FEBS Lett. — 1995. — Vol. 361. — P. 291–294.
5. Бєленічев І. Ф. Роль оксиду азоту в регулюванні фізіологічних функцій у нормі та при ішемічній патології / І. Ф. Бєленічев, В. О. Дмитряков, О. О. Бєляєва // Військова медицина України. — 2002. — Т. 2, № 3. — С. 48–59.
6. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов. — Донецк: Издательский дом Заславский, 2009. — 348 с.

7. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації / уклад. О. В. Стефанов. — К.: Авіценна, 2002. — 527 с.

8. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. — К.: ДФЦ МОЗ Украины, 2010. — 81 с.

9. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. — К.: МОРИОН, 2002. — 640 с.

10. David A. A. From angiogenesis to neuropathology / A. A. David // Nature. — 2005. — Vol. 438. — P. 954–959.

11. Генная и клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний / Р. Р. Исламов, А. А. Ризванов, Д. С. Гусева [и др.]. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2007. — Т. II, № 3. — С. 29–37.

12. Беленичев И. Ф. Возможная роль HSP-белков в реализации энерготропного механизма нейропротективного действия цереброкурина / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. — 2010. — Т. 6, № 1. — С. 31–36.

13. Беленичев И. Ф. Механизмы формирования ишемической нейродеструкции: соотношение оксида азота и тиол-дисульфидной системы как фактор, определяющий судьбу нейрона / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // Международный неврологический журнал. — 2009. — № 8. — С. 28–36.

14. Dery M. A. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators / M. A. Dery, M. D. Michaud, D. E. Richard // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2005. — Vol. 37. — P. 535–540.

