

Дослідження впливу адемоу на обмін монооксиду азоту в головному мозку щурів із черепно-мозковою травмою

Резюме. Актуальність. Високі концентрації оксиду азоту (NO) призводять до прогресування порушень мозкового кровообігу на фоні черепно-мозкової травми (ЧМТ). Одним із провідних молекулярних механізмів нейроцитопротекторної дії сучасних фармакологічних препаратів є їх коригувальний вплив на обмін NO. **Мета:** оцінити вплив адемоу порівняно з амантадином сульфатом на стан системи L-аргінін/NO в головному мозку щурів з ЧМТ. **Матеріали та методи.** Досліди проведено на щурах-самцях. Експериментальну модель тяжкої ЧМТ створювали із використанням пневматичного пістолета. Терапевтичну дію адемоу при ЧМТ оцінювали в дозі 2 мг/кг внутрішньовенно з інтервалом 2 р/добу протягом 8 діб. Як лікарський засіб для контрольної групи застосовували 0,9% NaCl в дозі 2 мл/кг, а препарат порівняння — амантадину сульфат — у дозі 5 мг/кг. Для визначення ефективності досліджуваних препаратів використовували рівень L-аргініну та сумарну активність NO-синтази. **Результати.** Порівняльний аналіз ефективності адемоу та амантадину сульфату на 8-му добу спостереження показав, що в групі тварин з ЧМТ, яким застосовували адемоу, вміст L-аргініну в мозку був більшим на 112 % ($p < 0,05$), ніж в групі контролю. За цих умов сумарна активність NO-синтази в головному мозку була меншою на 26,6 % ($p < 0,05$) відносно нелікованих тварин з ЧМТ. Натомість у тварин, лікованих амантадином сульфатом, рівень L-аргініну в головному мозку був більшим на 72 % ($p < 0,05$), ніж в групі контрольної патології. При цьому сумарна активність NO-синтази в головному мозку була меншою на 15,4 % ($p < 0,05$). **Висновки.** Експериментальне моделювання травматичного ураження головного мозку супроводжувалося розвитком в його структурах пертурбацій в системі L-аргінін/NO-синтаза. Одним із патогенетичних механізмів захисної дії на головний мозок при ЧМТ є спроможність адемоу попереджувати виснаження в пошкодженому головному мозку запасів амінокислоти L-аргініну та гіперактивацію NO-синтази, причому за вказаним ефектом адемоу перевершував амантадину сульфат ($p < 0,05$).

Ключові слова: черепно-мозкова травма; мозковий кровообіг; L-аргінін; NO-синтаза

Вступ

Черепно-мозкову травму (ЧМТ) в медицині сьогодні називають «тихою епідемією» внаслідок зростання масштабів цієї проблеми, низької обізнаності стосовно її значущості та неповноти епідеміологічних даних [1]. Щорічно в світі понад 10 млн людей помирають або шпиталізуються в зв'язку з ЧМТ [2]. Тяжкі форми ЧМТ діагностують у 20–40 % хворих з ЧМТ, при цьому з кожним роком спостерігається тенденція до збільшення числа більш тяжких ушкоджень мозку [2, 3].

ЧМТ є основною та найпоширенішою причиною інвалідизації і смертності осіб віком 20–40 років, смертність від ЧМТ у 10 разів вище, ніж від серцево-

судинних захворювань, і в 20 разів вище, ніж від злоякісних новоутворень [4, 5].

Велика кількість дослідників вважають, що основним механізмом розвитку ускладнень на фоні ЧМТ є порушення мозкової гемодинаміки [6–8]. Розвитку розладів судинної регуляції кровопостачання головного мозку на фоні ЧМТ сприяє накопичення вільнорадикальних форм кисню та оксиду азоту (NO), накопичення якого сприяє ураженню та розвитку некрозу нейронів. Провідна роль NO пов'язана з регулюванням судинного тону, а саме вазодилатацією, а також впливом на агрегацію та адгезію тромбоцитів. Таким чином, високі концентрації NO призводять до прогресування порушень мозкового кровообігу на фоні церебрального пошкодження [9, 10].

Одним із провідних молекулярних механізмів нейроцитопротекторної дії сучасних фармакологічних препаратів є їх коригувальний вплив на обмін NO, зокрема на розвиток в тканинах головного мозку нітрозативного стресу [9]. Тому доцільним було дослідити вплив нового церебропротектора, а саме похідного адамантану 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемола) на стан системи монооксиду азоту в головному мозку шурів при ЧМТ.

Мета: оцінити вплив похідного адамантану 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемола) порівняно з амантадином сульфатом та 0,9% розчином NaCl на стан системи L-аргінін/NO в головному мозку шурів із черепно-мозковою травмою.

Матеріали та методи

Досліди проведено на білих щурах-самцях масою 160–190 г, які перебували у стандартних умовах віварію, з дотриманням етичних норм проведення експериментальних досліджень згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 26.02.2006 р. Експериментальну модель ЧМТ викликали дією потоку вуглекислого газу під тиском, що створювали із використанням газобалонного пневматичного пістолета марки «Байкал МР-654К» (РФ, Іжевськ, № сертифікату РОСС RU МЖ03.В02518) та балонів вуглекислого газу (маса зрідженого CO₂ — 12 г) під тиском (Crosman, США, № серії 456739). Щурам в умовах пропофолового наркозу (60 мг/кг) після катетеризації стегнової вени та налагодження можливості здійснювати інфузію через інфузомат робили правобічну кістково-пластичну трепанацію черепа у проєкції середньої мозкової артерії, з діаметром отвору 5 мм². Після фіксації щура в положенні на животі вниз головою здійснювали постріл з фіксованої відстані (постріл впритул), кістковий фрагмент на окісті разом із апоневрозом повертали на місце і рану зашивали пошарово. Таким чином моделювалася ЧМТ тяжкого ступеня.

Терапевтичну дію адемола (адемола, Дарниця, Україна, 10 ампул по 5 мл концентрацією 1 мг/мл) на модельній ЧМТ оцінювали при застосуванні дози 2 мг/кг внутрішньовенно (в/в). Лікування відбувалось шляхом повільної внутрішньовенної інфузії інфузоматом, яка тривала 2 год, 2 р/добу (через кожні 12 год) упродовж 8 діб. Лікування розпочинали через 1 год після моделювання патологічного стану. Псевдооперованих тварин піддавали всім втручанням (наркоз, розріз шкіри,

кістково-пластична трепанація черепа), за виключенням маніпуляцій, які безпосередньо могли б призвести до травматичного ураження мозку, що нівелювало вплив травматичних умов експерименту. Їм також вводили еквівалентну кількість 0,9% розчину NaCl до дози адемола. Як лікарський засіб для контрольної групи застосовували 0,9% розчин NaCl в дозі 2 мл/кг в/в у тому ж режимі, а у групі порівняння амантадину сульфат (ПК-Мерц, Merz Pharmaceuticals, Швейцарія, 200 мг/500 мл) на модельній ЧМТ оцінювали при застосуванні 5 мг/кг внутрішньовенно у тому ж режимі.

Рівень L-аргінину визначали за реакцією Сакагучі, яка включає утворення забарвленого комплексу аргініну з альфа-нафтолом в присутності гіпоброміду в лужному середовищі. Сумарну активність NO-синтази (КФ 1.14.13.39) встановлювали за кількістю утвореного нітрит-аніону (NO₂⁻) після інкубації пост'ядерного супернатанту гомогенату мозку протягом 60 хв у середовищі, 1 мл якого містив 50 мМ KН₂РO₄-NaOH-буфер (рН 7,0), 1 мМ MgCl₂, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ НАДФН, 2,2 мМ L-аргінину [11].

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t Стюдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W Уайта — за його відсутності, парний критерій Т Вілкоксона — для визначення змін у динаміці всередині групи, кутове перетворення Фішера [12] — при обліку результатів в альтернативній формі (наявність або відсутність певної ознаки). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

Вивчення можливих механізмів захисної дії похідного адамантану 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемола) порівняно з 0,9% розчином NaCl та амантадину сульфатом (табл. 1) на травматично пошкоджений головний мозок у шурів показало, що у псевдооперованих тварин вміст L-аргінину коливався в діапазоні 58,9–64,2 нмоль/мг протеїну, а сумарна активність NO-синтази — 113–134 пмоль/хв на 1 мг протеїну. Станом на 8-му добу ЧМТ реєструвалось зниження запасів L-аргінину на 54,4 % ($p < 0,05$) та зростання сумарної активності NO-синтази в головному мозку шурів на 46,8 % ($p < 0,05$) порівняно з псевдооперованими тваринами. За цих умов рівень L-аргінину в мозку змінювався від 24,7 до 30,0 нмоль/мг протеїну, а сумарна активність NO-синтази була в межах 172–189 пмоль/хв на 1 мг протеїну.

Таблиця 1. Вплив курсової 8-денної інфузії адемола й амантадину сульфату на стан системи L-аргінін/NO в головному мозку шурів із черепно-мозковою травмою ($M \pm m$), $n = 7$

Групи тварин	Показник	
	L-аргінін, нмоль/мг протеїну	NO-синтаза, пмоль/хв на 1 мг протеїну
Псевдооперовані тварини + 0,9% розчин NaCl	60,8 ± 0,9	123,00 ± 3,28
ЧМТ + 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія)	27,70 ± 0,79 ¹	180,00 ± 2,78 ¹
ЧМТ + адемола, 2 мг/кг в/в	58,80 ± 0,73 ^{1, *} , #	132,00 ± 1,65 ^{1, *, #}
ЧМТ + амантадину сульфат, 5 мг/кг в/в	47,70 ± 0,86 ^{1, *}	152,00 ± 3,06 ^{1, *}

Примітки: ¹ — $p < 0,05$ відносно псевдооперованих тварин; * — $p < 0,05$ відносно групи контрольної патології; # — $p < 0,05$ відносно амантадину сульфату.

Використання досліджуваних препаратів, таких як адемом та амантадину сульфат, на тлі ЧМТ попереджує виснаження в головному мозку запасів амінокислоти L-аргініну та гіперактивацію NO-синтази, причому за вказаним ефектом адемом значно випереджав амантадину сульфат (табл. 1). У групі тварин з ЧМТ, яким застосовували адемом, вміст L-аргініну в мозку був більшим на 112 % ($p < 0,05$), ніж в групі контрольної патології, і коливався в межах 57,2–61,8 нмоль/мг протеїну (P_5 – P_{95}). За цих умов сумарна активність NO-синтази в головному мозку була меншою на 26,6 % ($p < 0,05$) відносно нелікованих тварин з ЧМТ і знаходилась в діапазоні 126–137 пмоль/хв на 1 мг протеїну (P_5 – P_{95}). Натомість у тварин, лікованих амантадином сульфатом, рівень L-аргініну в головному мозку був більшим на 72 % ($p < 0,05$), ніж в групі контрольної патології, і коливався в межах 44,8–50,1 нмоль/мг протеїну (P_5 – P_{95}). При цьому сумарна активність NO-синтази в головному мозку була меншою на 15,4 % ($p < 0,05$) відносно нелікованих тварин з ЧМТ і знаходилась в діапазоні 142–162 пмоль/хв на 1 мг протеїну (P_5 – P_{95}).

Обговорення

ЧМТ характеризується пошкодженням тканин головного мозку, що супроводжується набряком головного мозку, підвищенням проникності гематоенцефалічного бар'єру, розвитком посттравматичних когнітивних порушень. ЧМТ може спричинити розвиток глутамат-індукованої цитотоксичності, активує вивільнення запальних цитокинів з клітин мозку (мікроглії, нейронів, астроцитів), активує оксидантний та нітрозативний стрес, що зрештою призводить до апоптозу чи некрозу клітин головного мозку [9, 13].

Експериментальне моделювання травматичного ураження головного мозку у щурів супроводжувалось розвитком в його структурах пертурбацій в системі L-аргінін/NO-синтаза.

Останніми роками обговорюється важлива роль в механізмах вторинного пошкодження головного мозку оксиду азоту. Джерелом NO (синтезованого з L-аргініну) у центральній нервовій системі (ЦНС) є NO-синтаза ендотеліоцитів (ендотеліальна синтаза — eNOS), нейроглії і астроцитів (нейрональна синтаза — nNOS). У багатьох дослідженнях продемонстровано, що у фізіологічних концентраціях NO виконує надзвичайно різноманітні функції в ЦНС: регулює не тільки системний артеріальний тиск, але і регіонарний тонус судин, контролює активність нейронів, регуляцію викиду нейромедіаторів тощо. Також NO відіграє ключову роль в механізмах формування пероксинітритів, які належать до найбільш потужних прооксидантів і, таким чином, можуть забезпечувати патогенетичні механізми розвитку посттравматичних порушень [9, 14].

Досліджено, що в гострому посттравматичному періоді ЧМТ інгібування eNOS на тлі високої активності iNOS погіршує кровопостачання та сприяє прогресуванню набряку головного мозку. При дослідженні мозку загиблих від ЧМТ встановлено, що рівень експресії iNOS різко наростає вже через 4–8 годин після забиття головного мозку, максимальна активність її реєстру-

ється через 24–48 годин і зберігається підвищеною ще 10 діб. Токсичну дію надлишку NO вчені пов'язують з порушенням мітохондріального окисного фосфорилювання, утворенням пероксинітриту та гіперактивацією ПОЛ, ковалентною модифікацією білків при взаємодії з їх SH-групами, пошкодженням ДНК, а також посиленням недостатності трофічного забезпечення головного мозку [9, 13–15].

Аналіз лікувальної ефективності адемому на 8-му добу спостереження показав, що в групі тварин з ЧМТ, яким застосовували даний препарат, вміст L-аргініну в мозку був більшим на 112 % ($p < 0,05$), ніж в групі контролю, та сумарна активність NO-синтази в головному мозку була меншою на 26,6 % ($p < 0,05$) відносно нелікованих тварин з ЧМТ. Таким чином, серед нейроцитопротекторних властивостей адемому слід виділити його здатність попереджувати розвиток нітрозативного стресу та збільшувати запаси амінокислоти L-аргініну в клітинах головного мозку за умов ЧМТ.

Висновки

1. Експериментальне моделювання травматичного ураження головного мозку у щурів супроводжувалось розвитком в його структурах пертурбацій в системі L-аргінін/NO-синтаза.

2. Одним із патогенетичних механізмів захисної дії на головний мозок при ЧМТ є спроможність адемому попереджувати виснаження в пошкодженому головному мозку запасів амінокислоти L-аргініну та гіперактивацію NO-синтази, причому за вказаним ефектом адемом перевершував амантадину сульфат ($p < 0,05$).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

Список літератури

1. Carney N., Totten A.M., O'Reilly C. *Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury 4th Edition Reviewed for evidence-based integrity and endorsed by the American Association of Neurological Surgeons and the Congress of Neurological Surgeons. September 2016* [https://braintrauma.org/uploads/03/12/Guidelines for Management of Severe TBI 4th_Edition.pdf](https://braintrauma.org/uploads/03/12/Guidelines%20for%20Management%20of%20Severe%20TBI%204th%20Edition.pdf).
2. Majdan M., Plancikova D., Brazinova A., Rusnak M., Nieboer D., Feigin V., Maas A. *Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. Lancet Public Health. 2016 Dec. 1(2). e76-e83. doi: 10.1016/S2468-2667(16)30017-2.*
3. Abou El Fadl M.H., O'Phelan K.H. *Management of Traumatic Brain Injury: An Update. Neurosurg. Clin. N. Am. 2018. 29(2). 213-221.*
4. Llompарт-Pou J.A., Pérez-Bárcena J. *Geriatric traumatic brain injury: An old challenge. Med. Intensiva. 2019. 43(1). 44-46.*
5. Gardner R.C., Dams-O'Connor K., Morrissey M.R., Manley G.T. *Geriatric Traumatic Brain Injury: Epidemiology, Outcomes, Knowledge Gaps, and Future Directions. J. Neurotrauma. 2018. doi: 10.1089/neu.2017.5371.*
6. Семененко А.И. *Оценка терапевтического эффекта 0,9% раствора NaCl по показателям церебральной гемодинамики при ишемии-реперфузии головного мозга крыс. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2014. 3(47). 49-52.*

7. Hatefi M., Behzadi S., Dastjerdi M.M., Ghahnavieh A.A., Rahmani A., Mahdizadeh F., Hafezi Ahmadi M.R., Asadollahi K. Correlation of Homocysteine with Cerebral Hemodynamic Abnormality, Endothelial Dysfunction Markers, and Cognition Impairment in Patients with Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg.* 2017. 97. 70-79. doi: 10.1016/j.wneu.2016.09.080.

8. Семененко А.І., Кобеляцький Ю.Ю., Кондрацький Б.О., Семененко І.Ф. Особливості впливу деяких інфузійних розчинів на церебральну гемодинаміку при гострому ішемічному інсульті. *Медицина невідкладних станів.* 2016. 4(75). 118-121.

9. Uzan M., Tanriover N., Bozkus H. Nitric Oxide (NO) metabolism in the cerebrospinal fluid of patients with severe head injury: inflammation as a possible cause of elevated no metabolites. *Surg. Neurol.* 2001. 56(6). 350-356.

10. Ved R., Zaben M. Biomarkers for traumatic brain injury. 2018. 10. 855-852.

11. Гула Н.М., Косякова Г.В., Бердишев А.Г. Вплив N-стероїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту

в аорті та серці щурів із стрептозототиндукованим діабетом. *Укр. біохім. журн.* 2007. 79(5). 153-158.

12. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион, 2000. 320 с.

13. Werner C., Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth.* 2007. 99. 4-9.

14. Schwarzmair S.M., Terpolilli N.A., Dienel A., Gallozzi M., Schinzel R., Tegmeier F., Plesnila N. Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma.* 2015. 32(10). 731-738.

15. Huang X., Wan D., Lin Y., Xue N., Hao J., Ma N., Pei X., Li R., Zhang W. Endothelial Progenitor Cells Correlated with Oxidative Stress after Mild Traumatic Brain Injury. *Yonsei Med. J.* 2017. 58(5). 1012-1017.

Отримано/Received 19.11.2019

Рецензовано/Revised 02.12.2019

Прийнято до друку/Accepted 14.12.2019 ■

Семененко С.І., Семененко А.І., Полищук С.С., Вознюк Л.А., Семененко О.Н.
Винницький національний медичний університет ім. Н.І. Пирогова, г. Вінниця, Україна

Исследование влияния адемола на обмен оксида азота в головном мозге крыс с черепно-мозговой травмой

Резюме. Актуальность. Высокие концентрации оксида азота (NO) приводят к прогрессированию нарушений мозгового кровообращения на фоне черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Одним из ведущих молекулярных механизмов нейроцитопротекторного действия современных фармакологических препаратов является их корректирующее воздействие на обмен NO. **Цель:** оценить влияние адемола по сравнению с амантадином сульфатом на состояние L-аргинин/NO в головном мозге крыс с ЧМТ. **Материалы и методы.** Опыты проведены на крысах-самцах. Экспериментальную модель тяжелой ЧМТ создавали с использованием пневматического пистолета. Терапевтическое действие адемола при ЧМТ оценивали в дозе 2 мг/кг с интервалом 2 р/сутки в течение 8 суток. В качестве лекарственного средства для контрольной группы применяли 0,9% NaCl в дозе 2 мл/кг, а препарата сравнения — амантадина сульфат в дозе 5 мг/кг. Для определения эффективности исследуемых препаратов использовали уровень L-аргинина и суммарную активность NO-синтазы. **Результаты.** Сравнительный анализ эффективности адемола и амантадина сульфата на 8-е сутки наблюдения показал, что

в группе животных с ЧМТ, которым применяли адемола, содержание L-аргинина в мозге было больше на 112 % ($p < 0,05$), чем в группе контроля. В этих условиях суммарная активность NO-синтазы в головном мозге была меньше на 26,6 % ($p < 0,05$) относительно нелеченых животных с ЧМТ. Зато у животных, леченных амантадином сульфатом, уровень L-аргинина в головном мозге был больше на 72 % ($p < 0,05$), чем в группе контрольной патологии. При этом суммарная активность NO-синтазы в головном мозге была меньше на 15,4 % ($p < 0,05$). **Выводы.** Экспериментальное моделирование травматического поражения головного мозга сопровождалось развитием в его структурах пертурбаций в системе L-аргинин/NO-синтаза. Одним из патогенетических механизмов защитного действия на головной мозг при ЧМТ является способность адемола предупреждать истощение в поврежденном мозге запасов аминокислоты L-аргинина и гиперактивацию NO-синтазы, причем по указанному эффекту адемола превосходил амантадина сульфат ($p < 0,05$).

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; мозговое кровообращение; L-аргинин; NO-синтаза

S.I. Semenenko, A.I. Semenenko, S.S. Polishchuk, L.A. Vozniuk, O.N. Semenenko
National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

Investigation of ademol effect on the exchange of nitrogen monoxide in the brain of rats with traumatic brain injury

Abstract. Background. High concentrations of nitric oxide (NO) lead to the progression of cerebral circulation disorders against a background of traumatic brain injury (TBI). One of the leading molecular mechanisms of the neurocytoprotective action of modern pharmacological agents is their corrective effect on NO metabolism. **Purpose.** To evaluate the effect of ademol compared with amantadine sulfate on the state of the L-arginine/NO system in the brain of TBI rats. **Materials and methods.** The experiments were performed on male rats. An experimental model of heavy TBI was created using a pneumatic gun. The therapeutic effect of ademol in TBI was evaluated at a dose of 2 mg/kg intravenously twice per day for 8 days. As a drug for the control group 0.9% NaCl at a dose of 2 ml/kg was used, and the comparison drug was amantadine sulfate at a dose of 5 mg/kg. To determine the effectiveness of the study drugs the level of L-arginine and the total activity of NO-synthases were used. **Results.** A comparative analysis of the efficacy of ademol and amantadine sulfate on the 8th day of ob-

servation showed that in the TBI group of animals treated with ademol, L-arginine content in the brain was higher by 112 % ($p < 0.05$) than in the control group. Under these conditions, the total activity of NO-synthase in the brain was lower by 26.6 % ($p < 0.05$) compared to untreated TBI animals. However, in animals treated with amantadine sulfate, the level of L-arginine in the brain was 72.0 % higher ($p < 0.05$) than in the control pathology group. The total activity of NO-synthase in the brain was lower by 15.4 % ($p < 0.05$). **Conclusion.** Experimental modelling of traumatic brain injury was accompanied by the development in its structures of perturbations in the L-arginine/NO-synthase system. One of the pathogenic mechanisms of the brain protective effect on TBI is the ability of ademol to prevent depletion of L-arginine amino acid reserves in the damaged brain and hyperactivation of NO-synthase, with ademol exceeding amantadine sulfate ($p < 0.05$).

Keywords: traumatic brain injury; brain circulation; L-arginine; NO-synthase