

## КЛАСТОГЕННЫЕ, АНЕУГЕННЫЕ ПРООКСИДАНТНЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ НЕЙРОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Д. Д. Гайнетдинова, В. В. Семенов, М. Ф. Исмагилов, В. С. Харитонов<sup>1</sup>

В экспериментальных и клинических исследованиях оценивали мутагенную, анти-мутагенную, про- и антирадикальную активность некоторых нейротропных препаратов — церебролизина, пиритинола (энцефабол), пирацетама (ноотропил), актовегина и винпоцетина (кавинтон). В химических, ферментативных и клеточных модельных системах только церебролизин ингибировал генерацию супероксидного анион-радикала, монооксида азота и конечных продуктов деградации цепей жирных кислот. Другие препараты проявляли как анти- так и прооксидантный эффект. Наибольшей антикластогенной активностью в опытах на *C. capillaries* обладал церебролизин. Энцефабол проявил наибольший прооксидантный эффект и низкую антикластогенную активность. В клинике исследована способность церебролизина и энцефабола снижать высокий уровень эритроцитов с микроядрами в периферической крови больных детским церебральным параличом (спастическая диплегия). Модифицирующий эффект препаратов был не однозначен: церебролизин в большей степени, чем энцефабол, снижал интенсивность анеу- и кластогенеза у больных. Более эффективно протекторный эффект препаратов на 10-й день приема реализовался в группе мальчиков, а на 20-й день — в группе девочек.

**Ключевые слова:** супероксид, окись азота, перекисное окисление липидов, антирадикальная активность, анеугенез, антимутагенез, нейротропные средства, эритроциты с микроядрами, детский церебральный паралич

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время появились данные о наличии в патогенезе детского церебрального паралича (ДЦП) важного звена — неспецифического повреждения генома [1]. Являясь типовым патологическим процессом, оно реализуется в нарушение нормальной экспрессии генов, что существенно осложняет течение заболевания, снижает эффективность лечения и делает прогноз крайне неблагоприятным. В то же время имеется разработанная и хорошо зарекомендовавшая себя на практике фармакологическая теория защиты генома, которая предполагает использование в коррекции повреждений генетического аппарата средства, у которых наряду со специфической фармакологической активностью выражен и антимутагенный компонент [2]. Вышесказанное определило цель исследования: в эксперименте оценить антимутагенную и антиоксидантную активность некоторых нейротропных средств, применяемых в комплексной терапии хронически-резидуальной стадии ДЦП, по результатам отобрать наиболее (и наименее) активные вещества и в клинических исследованиях оценить их способность нормализовать процессы, дестабилизирующие геном у больных ДЦП.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментальных и клинических исследований использовали нейротропные средства, применяемые при лечении хронически-резидуальной стадии ДЦП: церебролизин (“Ebewe”), энцефабол (“Nycomed”), ноотропил (“Pliva d.d.”) и его отечественный аналог пирацетам (Мосхимфармпрепараты), кавинтон (“Gedeon Richter”), актовегин (“Nycomed”) [4].

#### Экспериментальные исследования

1. Антикластогенную активность (АКА) препаратов (и ее расчет) оценивали цитогенетическим методом на клетках *Crepis capillaries* в соответствии с рекомендацией [7]. В качестве индуктора мутаций использовали этилметансульфонат (“Sigma”). Обработку клеток препаратами и мутагеном проводили в фазе предсинтеза ДНК в профилактическом режиме.

2. Антирадикальную активность препаратов определяли по их антиоксидантной активности (АОА), способности взаимодействовать с супероксидным анион-радикалом ( $O_2^{*-}$ ) и монооксидом азота ( $NO^*$ ) [13]. Методы исследования: спектрофотометрический, хемилюминесцентный, ЭПР-спектроскопический.

а. *Определение антиоксидантной активности (АОА).* Перекисное окисление желточных липопротеинов во всех пробах инициировали добавлением  $FeSO_4$ . После инкубации добавляли 500 мкл 20 % тетрахлоруксусной кислоты и 100 мкл  $10^{-2}$  М ионола. Образцы центрифугировали и добавляли 0,5 % 2-тио-

<sup>1</sup> Кафедра неврологии, нейрохирургии с курсом медицинской генетики (зав. — проф. М. Ф. Исмагилов) и кафедра медицинской биологии и генетики (зав. — проф. В. В. Семенов) Казанского государственного медицинского университета, Казань, 420012, ул. Бутлерова, 49.

барбитуровой кислоты. Оценивали светопоглощение (А) при 532 нм. Результаты рассчитывали по формуле:

$$\text{АОА \%} = \frac{A_{\text{к}} - A_{\text{оп}}}{A_{\text{к}}} \times 100\%, \text{ где}$$

$A_{\text{к}}$  —  $A_{532}$  в контрольном образце,  $A_{\text{оп}}$  —  $A_{532}$  в опытном (содержащем исследуемый препарат) образце.

Об активности препарата судили по его концентрации ( $C_{50}$ , мкл/мл) добавление которой к смеси снижало интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) на 50 %.

б. *Супероксиддисмутазная (SOD)-активность препаратов* (способность взаимодействовать с супероксидным анион-радикалом) оценивали методом люцигенин-активированной хемилюминесценции в реакции ксантина с ксантинооксидазой. Реакцию запускали добавлением 25 мкМ ксантина и измеряли уровень хемилюминесценции в контрольной пробе. В опытные пробы вносили известные концентрации препаратов. Измерения проводили в режиме слежения при перемешивании. SOD-активность препаратов определяли по его концентрации ( $C_{50}$ , мкл/мл), добавление которой к смеси снижало интенсивность образования супероксидного анион-радикала на 50 %.

в. *Взаимодействие препаратов с монооксидом азота* оценивали методом, основанным на специфическом взаимодействии монооксида азота ( $\text{NO}^*$ ) и спиновой метки РТЮ, обладающей известным ЭПР-спектром. Источником монооксида азота служит соединение SIN-1, генерирующее  $\text{NO}^*$  с постоянной скоростью. Продуктом взаимодействия является РТ. Это приводит к появлению дополнительных пиков в ЭПР-спектре. Количественное определение  $\text{NO}^*$  проводится вычислением относительной высоты образовавшихся пиков. Активность препаратов определяли по его концентрации ( $C_{50}$ , мкл/мл), добавление которой к смеси снижало интенсивность образования окиси азота на 50 %. Регистрацию спектров ЭПР проводили на спектрометре LFR-30 Free Radical Analyzer (JEOL, Япония).

#### *Цитогенетический метод микроядерного анализа*

Для регистрации эритроцитов с микроядрами просматривали мазки периферической крови больных до лечения. Свежие высушенные мазки фиксировали

70 – 90 % этиловым спиртом 3 мин. Сухие препараты окрашивали в растворе азури-эозинового красителя Романовского – Гимза 1:5 на дистиллированной воде рН 6,8 20 мин и хорошо промывали. От каждого больного просматривали 1 – 2 мазка, в каждой мазке подсчитывали не менее 20 000 эритроцитов, что позволило проводить исследования в группах с малой выборкой.

#### *Клиническое исследование*

В исследование двух препаратов — церебролизина и энцефабола — после информированного согласия включено 20 больных (9 девочек и 11 мальчиков) 2 – 10 лет с диагнозом: ДЦП, спастическая диплегия средней степени тяжести. Выбор формы — спастическая диплегия — определен ее промежуточным положением по уровню цитогенетических нарушений по сравнению с другими клиническими формами ДЦП [1]. У всех пациентов обязательным условием на время эксперимента было отсутствие сопутствующих соматических заболеваний. Эффективность монотерапии церебролизинном и энцефаболом оценивали по клиническим показателям, уровню эритроцитов с микроядрами (ЭМ) и проценту снижения уровня ЭМ — антианеугенной активности. Уровень ЭМ определяли в трех точках: в день начала монотерапии (до лечения), через 10 и 20 дней лечения.

Церебролизин вводили внутримышечно 1 раз в день, по утрам, в стандартной суточной дозе из расчета 1 мл препарата на 10 кг веса ребенка. Энцефабол применяли внутрь по 50 мг от 2 до 5 лет и по 100 мг — от 6 до 10 лет 3 раза в день спустя 30 мин после еды. Препараты не назначали детям с эпилепсией и некупированными пароксизмальными реакциями.

Статистическую обработку данных осуществляли стандартными методами с использованием параметрических критериев значимости: для сравнения средних величин — *t*-критерий Стьюдента, для сравнения дисперсий — *F*-критерий Фишера.

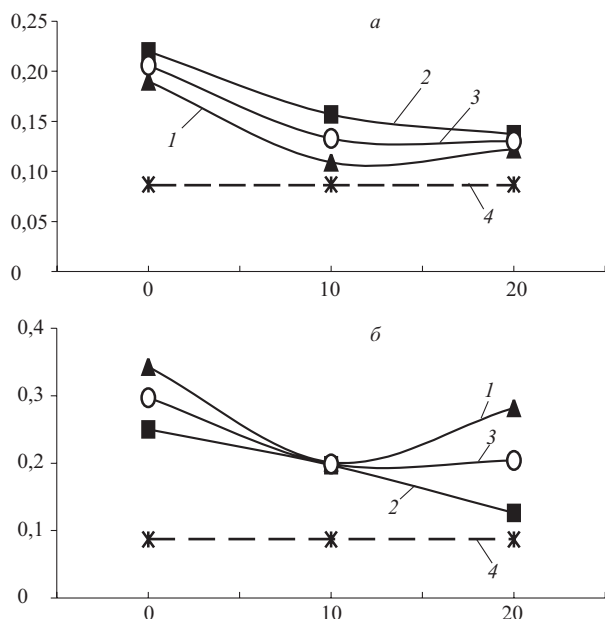
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В опытах на модельных системах только церебролизин и в меньшей степени актовегин ингибировали образование всех взятых в исследование активных форм кислорода (АФК) — супероксида, окиси азота и

Таблица 1. Антимутагенный и антирадикальный эффект нейротропных препаратов

Препарат	АКА, %	Концентрации препаратов ( $C_{50}$ , в мкл/мл) снижающие образование АФК на 50 %		
		ПОЛ	SOD-активность	Монооксид азота
Ноотропил	14,5***	40*	Прооксидант	Эффект отсутствует
Актовегин	6,9***	43*	Более 100, эффект слабый	24,00*
Пирацетам	14,7***	65*	Прооксидант	Эффект отсутствует
Церебролизин	43,0*	82*	60*	4,25**
Кавинтон	24,6**	Более 100	Прооксидант	Эффект отсутствует
Энцефабол	18,2***	Прооксидант	Прооксидант	33,70*

**Примечание.** Различия достоверны при: \* —  $p < 0,001$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p > 0,05$ . АКА — антикластогенная активность.



Динамика уровней эритроцитов с микроядрами у больных ДЦП при монотерапии церебролизином (а) и при монотерапии энцефалом (б).

По оси абсцисс — день приема, по оси ординат — уровень эритроцитов с микроядрами, %. 1 — мальчики, 2 — девочки, 3 — общая группа, 4 — здоровые.

продуктов ПОЛ. Это подтверждает данные других исследователей [2, 11] и объясняется, скорее всего, аддитивным антиоксидантным эффектом компонентов, которые входят в лекарственную форму препаратов (например, селен, некоторые аминокислоты и т.д.). В тех же случаях, когда активное начало препарата было представлено одним химическим веществом (ноотропил-пирацетам, кавинтон-винпоцетин, энцефалол-пиритинол), препарат ингибировал одни формы свободных радикалов, стимулировал другие (прооксидантный эффект) или оставался нейтральным. С этих позиций идентифицировать потенциальный оксидантный статус некоторых препаратов практически невозможно. Это можно сделать только в конкретных условиях по отношению к конкретной форме свободного радикала. Учитывая это, вопрос о лекарственной форме препарата, используемого в качестве антиоксиданта, имеет принципиальное значение. Разнонаправленный характер действия исследованных препаратов ставит вопрос о разной чувствительности АФК-обра-

зующих процессов к лекарственным препаратам. И действительно, анализ полученных результатов показал, что наибольшей чувствительностью к модифицирующему действию нейротропных средств обладал процесс образования продуктов ПОЛ — его ингибировали все препараты, кроме энцефабола. Меньшей чувствительностью обладал процесс, генерирующий монооксид азота (его подавляли три препарата из шести) и, наконец, процесс, формирующий супероксидный анион-радикал, оказался наиболее резистентным — ему препятствовал только церебролизин (табл. 1).

Разрабатывая проблему лекарственного антимуtagenеза ряд исследователей [3] выдвинули предположение, что у некоторых препаратов специфическая активность может сочетаться с антимуtagenной. И действительно, церебролизин и в меньшей степени кавинтон обнаружили способность подавлять интенсивность химически-индуцированного мутагенеза (на 43 и 24,6 % соответственно) (табл. 1). Другие лекарственные препараты такими свойствами не обладали. Антикластогенная активность церебролизина может быть связана с антиоксидантными свойствами компонентов, которые входят в его лекарственную форму. В отличие от церебролизина и других препаратов лишь энцефалол показал низкий антикластогенный эффект наряду с прооксидантной активностью в отношении индукции ПОЛ и супероксидного анион-радикала. Поэтому по результатам наших экспериментов и литературным данным для клинических исследований мы избрали два препарата из группы ноотропов — церебролизин и энцефалол.

В результате лечения больных церебролизином и энцефалом отмечена положительная клиническая динамика: у 9 из 10 детей, принимавших церебролизин, и у 8 из 10 больных, принимавших энцефалол. У больных снижался спастический гипертонус в пораженных конечностях, расширялся объем активных движений, уменьшались глазодвигательные нарушения. Родители отмечали, что на фоне терапии церебролизином у детей возрастает интерес к окружающему миру, улучшаются речевые навыки и навыки запоминания. При приеме энцефабола улучшаются характеристики поведения, повышается общий жизненный тонус, отмечаются положительные сдвиги в эмоциональной сфере.

На 10-й и 20-й день приема церебролизин и энцефалол существенно снизили высокий уровень ЭМ у больных в общей группе и в подгруппах мальчиков и девочек (табл. 2.). Это свидетельствует о наличии у препаратов способности подавлять интенсивность анеугенеза на уровне целого организма. При этом важно подчеркнуть два момента (табл. 1). Во-первых, препараты снижали интенсивность анеугенеза не до физиологической нормы, а в лучшем случае наполовину (от 17,5 до 50 %). Во-вторых, в группе детей, принимавших церебролизин, и у мальчиков, и у девочек на

Таблица 2. Антианеугенная активность препаратов (в %) у больных ДЦП при монотерапии церебролизином и энцефалом

День приема	Церебролизин			Энцефалол		
	Общая группа	Мальчики	Девочки	Общая группа	Мальчики	Девочки
10-й	35,6	42,6	29,4	32,7	41,2	21,2
20-й	37,0	35,7	38,0	33,7	17,5	50,0

Примечание. Во всех случаях  $p < 0,001$ .

10-й и 20-й день терапии уровень ЭМ плавно снижался и уменьшился почти в два раза (рисунок, а).

В то же время, в группе больных, принимавших энцефабол, выявлены половые различия регресса числа ЭМ: у мальчиков антианеугенная активность к 20 дню терапии оказалась существенно ниже, чем у девочек (рисунок, б). Можно предположить, что это в некоторой степени отражает различия в механизмах антианеугенеза, индуцированного этими препаратами, а также наличие (по крайней мере, у энцефабола) двух этапов в реализации этих механизмов.

При сопоставлении антимуtagenного, про- и антиоксидантного эффектов препаратов в модельных системах и анеугенного эффекта в клинике каких либо общих закономерностей не выявлено. Это может прежде всего свидетельствовать о том, что не все повреждения генома являются результатом действия свободных радикалов. Кроме того, при переходе на более высокий уровень организации может существенно измениться и механизм действия препарата. Его прямая (*in vitro*) антирадикальная реакция перестает быть решающей (*in vivo*), а на первое место выходят механизмы, способные нормализовать работу метаболических циклов кластогенеза путем воздействия на их разные звенья. Так, при ДЦП развитие типового патологического процесса — ацидоза приводит к нарушению ряда метаболических звеньев: снижается активность адренорецепторов сердца, сосудов и кишечника, повышается содержание в крови катехоламинов, усиливаются парасимпатические эффекты, между клеткой и плазмой крови перераспределяются протоны, ионы калия, хлора и др. ионы, существенно нарушается метаболизм некоторых аминокислот (например, глутамата, аспартата и др.) и т.д. [6]. Это в свою очередь нарушает нормальное течение биохимических процессов, содержащих в качестве промежуточных продуктов эндомутагены (например, АФК, глутамат, гистамин и др.). Последствия предсказуемы — пул эндомутагенов в организме повышается и, как следствие, нарушается нормальная структура генома [1]. С этих позиций антианеугенный эффект церебролизина и энцефабола является непрямым, а осуществляется косвенно через нормализацию кислотно-основного баланса. Кроме того, установлено, что в клетках, лишенных нейротрофической регуляции (что типично для ДЦП [12]) повышена интенсивность кластогенеза. Восстанавливая нейротрофический контроль, церебролизин параллельно защищает генетический аппарат клетки от дальнейшего повреждения. И, наконец, одной из причин появления в периферической крови эритроцитов с микроядрами может быть повреждение генома эритробластов свободными радикалами и другими мутагенными продуктами в результате активации “дыхательного взрыва” в макрофагах эритробластных островков костного мозга в результате гипоксии [8]. Одновременно при гипоксии любого генеза в организме повышается уровень стимуляторов эритропоэза —

эритропоэтина и андрогенов, что уменьшает время восстановления первичных повреждений ДНК. Церебролизин, повышая эффективность аэробного метаболизма, нормализует скорость эритропоэза, увеличивая тем самым время восстановления потенциальных повреждений ДНК. Это предположение находит косвенное подтверждение в постоянной регистрации более эффективного антианеугенеза у девочек, чем у мальчиков, после 10-го дня назначения препаратов. Как известно эстрогены являются ингибиторами эритропоэза [9]. В этих условиях увеличивается репарация первичных повреждений ДНК и соответственно снижается их реализация в видимые перестройки. Не исключается и другой механизм антиоксидантного действия эстрогенов — ингибирование НАДФН и аскорбатзависимых систем ПОЛ в микросомах, повышение уровня каталазы и т.д.

Все вышесказанное свидетельствует о том, что антианеугенную и антикластогенную активность препаратов на уровне целого организма в ряде случаев следует рассматривать в связи с метаболическими циклами кластогенеза, основываясь на плейотропном характере действия антимуtagenов. Последний часто является результатом активации комплементарных к антимутагену рецепторов.

## ВЫВОДЫ

1. В экспериментальных исследованиях некоторые нейротропные средства показали различную степень антимуtagenной и антиоксидантной активности. Наиболее эффективным по изученным свойствам оказался церебролизин.
2. Церебролизин и энцефабол снижают у больных ДЦП высокий уровень эритроцитов с микроядрами в периферической крови.
3. Динамика снижения уровней эритроцитов с микроядрами зависела от препарата и пола больного.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Д. Гайнетдинова, В. В. Семенов, М. Ф. Исмагилов, И. А. Пахалина и др., *Каз. мед. ж.*, № 4, 263 – 268 (2004).
2. А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин, *Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействий*, Медицина, Москва (1998).
3. А. Д. Дурнев, *Вестн. РАМН*, № 10, 70 – 76 (2001).
4. Н. Н. Заваденко, *Ноотропные препараты в практике педиатра и детского невролога*, Москва (2003).
5. В. Г. Зайцев, О. В. Островский, В. И. Закревский, *Экспер. и клин. фармакол.*, 66(4), 66 – 70 (2003).
6. А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов, *Общая патофизиология*, ЭЛБИ-СПб, Санкт-Петербург (2001).
7. В. В. Семенов, Е. С. Кошпаева, А. В. Семенов, *Оценка антимуtagenной активности веществ на семенах *Crepis capillaries* в скрининговых исследованиях*, КГМУ, Казань (2000).
8. В. С. Харитонов, В. В. Семенов, Б. И. Барабанщиков, *Бюл. экспер. биол.*, № 7, 66 – 70 (2001).
9. Д. Ф. Шиффман, *Патофизиология крови*, Бином. — С-Пб.: Невский Диалект, Санкт-Петербург (2001).

10. I. A. Buhimschi, C. S. Buhimschi, M. Pupkin, and C. P. Weiner, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **189**(1), 181 – 188 (2003).
11. T. A. Deviatkina, E. M. Vazhnichaya, and R. V. Lytsenko, *Eksp. Klin. Farmakol.*, **63**(4), 38 – 41 (2000).
12. U. Maurer, *Wien. Med. Wochensch.*, **152**(1 – 2), 14 – 18 (2002).
13. F. Plaisant, A. Clippe, D. Vander Stricht, et al., *Free Radic Biol Med.*, **34**(7), 862 – 72 (2003).

Поступила 22.03.05

## **CLASTOGENIC, ANEUGENIC, PRO- AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SOME NEUROTROPIC PREPARATIONS**

**D. D. Gainetdinova, V. V. Semenov, M. F. Ismagilov, and V. S. Kharitonov**

Kazan State Medical University, ul Butlerova 49, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia

In experimental and clinical investigations, assessment was made of mutagenous, antimutagenous, pro- and antiradical activity of some neurotropic preparations — cerebrolysin, encephabol (pyritinol), nootropil (piracetam), actovegin and cavinton (vinpocetine). In chemical, fermentative and cellular model systems, cerebrolysin inhibited generation of superoxide anion-radical, nitrogen monoxide and final products of degradation of fatty acids. Other preparations showed both anti- and prooxidant effect. The most pronounced anticlastogenic activity during experiments on C. capillaries had a cerebrolysin. Encephabol had the most prooxidant effect and low anticlastogenic activity. The ability of such preparations as cerebrolysin and encephabol to decrease erythrocyte high level with micronuclei in peripheric blood of patients with infantile cerebral palsy (spastic diplegia) was clinically investigated. The modifying effect of preparations was not univalent: it was cerebrolysin that decreased intensivity of aneu- and clastogenesis in patients in a greater degree than encephabol. A protective effect of these preparations was pronounced on the 10th day in group of the boys, and on the 20th day in the group of the girls.