

© Соловьева Э.Ю., Карнеев А.Н., Чеканов А.В., Баранова О.А., Щелконогов В.А., Фарахова К.И., Федин А.И., 2019

УДК 616.831–005.4–085.214.2

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.1.74–80

Изучение мембранопротективного и антиоксидантного потенциалов цитиколина и этилметилгидроксипиридина при комбинированном применении

Э.Ю. Соловьева, А.Н. Карнеев, А.В. Чеканов, О.А. Баранова, В.А. Щелконогов, К.И. Фарахова, А.И. Федин

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова (117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1)

Цель исследования: анализ антиоксидантных эффектов 2-этил-6-метил-3-оксипиридина-сукцината («Нейрокс») и цитиколина («Нейпилепт») и сравнение мембранопротективного потенциала комбинации этих препаратов в разных схемах лечения пациентов с хронической ишемией мозга. **Материал и методы.** В исследование включены 40 больных (18 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 54 до 72 лет с хронической ишемией мозга второй стадии в фазе декомпенсации. 1-я группа пациентов (14 человек) в дополнение к базовой схеме получала «Нейрокс», 2-я группа (13 человек) – «Нейпилепт», 3-я группа – комбинацию этих препаратов. Контроль – группа условно здоровых лиц (8 мужчин и 6 женщин) в возрасте от 24 до 42 лет. **Результаты исследования.** Зарегистрировано достоверное увеличение активности супероксиддисмутазы в плазме крови после завершения лечения при комплексной терапии препаратами «Нейрокс» и «Нейпилепт». Обнаружено достоверное увеличение количества восстановленных SH-групп после лечения «НейроКСом». При исследовании качественного и количественного состава фосфолипидов клеток крови у пациентов, принимавших «Нейрокс», не найдено достоверных значительных изменений в массе фосфолипидов, в то время как при применении «Нейпилепта», а также при комплексном применении этих препаратов происходило увеличение содержания и общей массы фосфолипидов. **Обсуждение полученных данных.** Клинические данные и результаты биохимического анализа указывают на целесообразность использования этилметилгидроксипиридин сукцината и цитиколина, а также их комбинации в рамках нейропротективной терапии хронической ишемии мозга.

Ключевые слова: ишемия мозга, нейпилепт, нейрокс, фосфолипиды

В нейронах головного мозга, находящихся в зоне ишемического повреждения, происходит нарушение цикла Кеннеди, и, как следствие, развивается окисление мембранных фосфолипидов до фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и сфингомиелина. Свободные радикалы и активные формы кислорода (АФК) способствуют модификации белков, ферментов, рецепторных комплексов, ионных каналов, а также активируют перекисное окисление липидов (ПОЛ), ведущее к повреждению фосфолипидного бислоя мембран [2, 12].

Массивное накопление в цитоплазме ишемизированных клеток ионов Na^+ , Ca^{2+} и аденозиндифосфата приводит к чрезмерному стимулированию образования кислородных радикалов в митохондриях и связанного с этим нарушением функционирования в них электрон-транспортной цепи. Все это способствует развитию отека и дегенерации органелл, а в дальнейшем – потере целостности мембран и некрозу клеток. Развивающаяся энергетическая недостаточность приводит к быстрой утрате аденозинтрифосфорной кислоты и неконтролируемой утечке ионов через клеточную оболочку. В результате развивается деполяризация мембран и высвобождение нейротрансмиттеров – глутамата и допамина. Избыточное высвобождение глутамата и стимуляция его рецепторов приводит к активации фосфолипаз с последующим гидролизом фосфолипидов фосфолипазой

A_2 и высвобождением арахидоновой кислоты, которая, претерпевая ферментативное и неферментативное окисление циклооксигеназой, образует гидропероксиды и пероксильные радикалы. Патобиохимическим финалом этих процессов становится апоптотическая или некротическая гибель клетки [12].

Повреждение мембранных фосфолипидов нейронов приводит к нарушению процесса липолиза, что способствует активации протеинкиназы С, сфингомиелиназы, выходу внутриклеточного кальция и к образованию церамида и АФК. Продукты гидролиза (церамид и сфингозин) считаются важными компонентами мембран клеток центральной нервной системы и участвуют в их развитии, жизнедеятельности и гибели [7].

Церамид не просто участвует в процессе клеточного сигналинга, приводящего к клеточной гибели, а служит одним из регуляторов баланса между пролиферацией и программируемой клеточной гибелью. Изменения, происходящие во внутриклеточных сигнальных путях под воздействием церамида, оказывают влияние на окислительно-восстановительные реакции, протекающие в цитоплазме и ПОЛ. Тем самым церамид помогает развитию митохондриальной дисфункции и активации окислительного стресса. Нарушение функционирования электрон-транспортной цепи способствует деполяризации мембран и высвобождению глутамата и допамина. Последнее приводит к активации фосфолипаз и гидролизу фосфолипидов фосфолипазой A_2 с высвобождением арахидоновой кислоты, в ходе

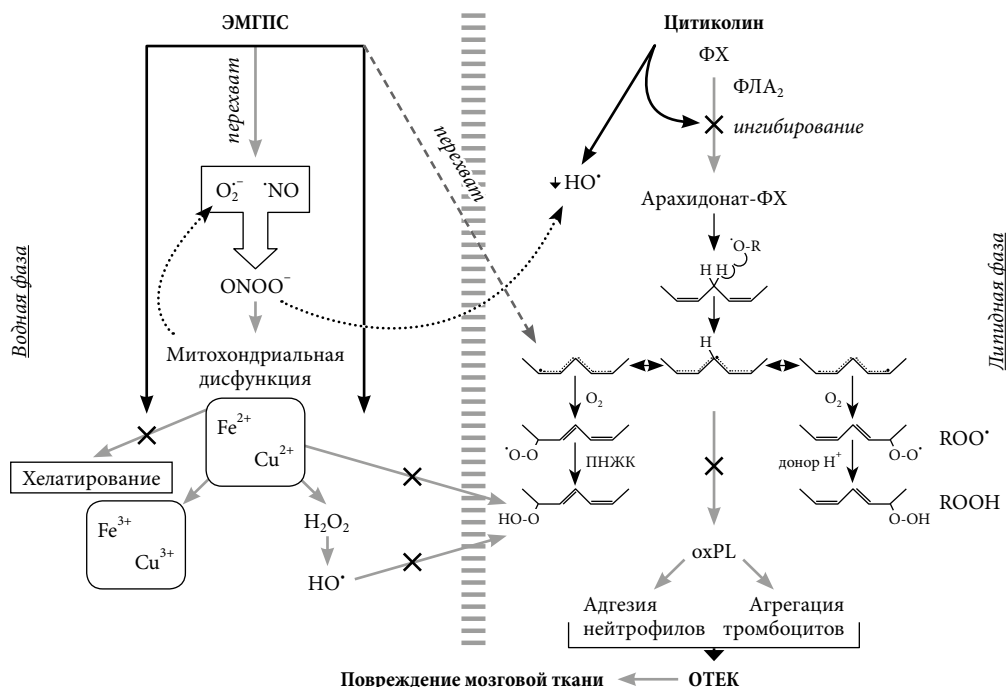


Рис. 1. Влияние ЭМГПС и цитиколина на свободно-радикальные процессы в водной и липидной фазах:

ФЛА₂ – фосфолипаза А₂, ФХ – фосфатидилхолин, окPL – окислительно модифицированные фосфолипиды, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

окисления которой циклооксигеназой образуются гидропероксиды и пероксильные радикалы [10, 11]. Таким образом существующая в живых клетках взаимосвязь между окислительной системой и сфингомиелиновым циклом вносит существенный вклад в ишемическое повреждение и в дальнейшем – в апоптоз.

В литературе широко обсуждаются нейропротективные, в том числе антиоксидантные, свойства 2-этил-6-метил-3-оксипиридина-сукцината (этилметилгидроксипиридина сукцината – ЭМГПС) и цитиколина в ситуациях острого и хронического нарушений мозгового кровообращения [9].

ЭМГПС – производное пиридина, представляющее собой комбинацию двух молекул эмоксипина и янтарной кислоты [1]. Имея структурное сходство с пиридоксином (В₆), он облегчает внутриклеточное проникновение янтарной кислоты, что способствует реактивации митохондрий путем восстановления функционирования цикла Кребса и синтеза аденозинтрифосфата. В результате антиоксидантного действия ЭМГПС происходит снижение уровня супероксид-анион-радикала, образующегося при преобразовании молекулы кислорода в анион-радикал электронами, высвобождающимися из комплексов I и/или III электрон-транспортной цепи митохондрий. Снижение уровня супероксид-анион-радикала происходит и при прямом перехвате ЭМГПС, а также при активации супероксиддисмутазы. При этом супероксид-анион-радикал не взаимодействует с монооксидом азота: результатом подобной реакции может стать образование нерадикального, но цитотоксичного пероксинитрита. Пероксинитрит, повреждая мембраны митохондрии,

способствует развитию митохондриальной дисфункции, при которой происходит увеличение синтеза супероксид-анион-радикала, что замыкает «порочный круг повреждения». В дальнейшем пероксинитрит, образующийся в данной реакции, разлагается с образованием радикала гидроксила (рис. 1).

Многочисленные эксперименты показали, что ЭМГПС, подавляя ПОЛ в клеточных мембранах, повышает резистентность липопротеиновых комплексов к этому процессу, восстанавливая таким образом активность эндогенной антиоксидантной системы [3]. При этом нужно заметить, что антиоксидантные свойства ЭМГПС заключаются не только в прямом перехвате АФК и влиянии на активацию супероксиддисмутазы, но и в снижении концентрации металлов переменной валентности путем их хелатирования (рис. 1).

В ходе многолетних исследований свойств этого препарата было установлено, что он обладает как антиокислительными, так и мембранопротекторными свойствами. ЭМГПС имеет свойство уменьшать вязкость биомембран, увеличивать их текучесть и восстанавливать конформацию мембранных белков, тем самым повышая липид-белковое соотношение, что оказывает стабилизирующее действие на биомембраны [5]. Он также способствует торможению активации внутриклеточной сигнальной системы (снижение внутриклеточного каскада активации прокаспаз 1, 2, 3, 6, 8 и уровня экспрессии каспазы-3), что предотвращает апоптоз. Возвращаясь к тому, что было сказано выше, следует отметить, что восстанавливая работу цикла Кребса и трансмембранного транспорта ионов, ЭМГПС предотвращает выход во внеклеточное

пространство глутамата и развитие эксайтотоксичности.

Другой препарат – цитиколин – представляет собой комплексную органическую молекулу, экзогенную форму цитидин-5'-дифосфохолина (важнейший промежуточный продукт в образовании фосфатидилхолина), которая функционирует как интермедиат в биосинтезе мембранных фосфолипидов, окисляющихся при ишемии головного мозга до жирных кислот и свободных радикалов (рис. 1). Основу цитидин-5'-дифосфохолина составляют рибоза, пирофосфат, цитозин и холин.

Цитидин – основной компонент РНК – в цитоплазме превращается в цитидинтрифосфат. В тоже время холин под действием холинкиназы фосфорилируется до фосфорилилхолина, который в дальнейшем трансформируется в цитихолин. Далее цитихолин, взаимодействуя с диацилглицерином в присутствии холинфосфотрансферазы, преобразуется в фосфатидилхолин [9, 14]. Следует отметить, что стабилизация мембраны цитиколином приводит к увеличению скорости связывания таких ферментов как супероксиддисмутаза с его субстратами и увеличения активности данного соединения [9, 10]. В то же время цитиколин аккумулирует на мембранной поверхности клетки главный неферментный компонент антиоксидантной системы – α -токоферол, что приводит к снижению образования гидропероксидов жирных кислот и соответствующих пероксильных радикалов (рис. 2), которые служат одной из основных причин генерации окислительно-модифицированных фосфолипидов. Активация внутриклеточной сигнальной системы и ингибирование функции протеасом провоцирует клеточную смерть и развитие в последующем некроза мозговой ткани [9].

Блокируя образование окислительно-модифицированных фосфолипидов путем снижения активации фосфолипазы A_2 и восстановления активности митохондриальной АТФазы и мембраной Na^+/K^+ -АТФазы, цитиколин проявляет свои антиоксидантные свойства. Кроме того, высвобождающийся из цитихолина холин способен метаболизироваться через AdoMet-путь до глутатиона – одного из основных эндогенных антиоксидантных компонентов защиты головного мозга.

ЭМГПС и цитиколин осуществляют свое действие на нескольких уровнях ишемического каскада, зачастую пересекаясь. Кроме того, реакция триметилирования азотсодержащих соединений холином происходит в присутствии витаминов группы В, в том числе и B_6 , структурным аналогом которого служит ЭМГПС [9], что позволяет думать о взаимодополняющем действии указанных препаратов. Однако в литературе до сих пор не описано комбинированного применения нейропротективных средств, работающих как в липидной (ЭМГПС), так и в водной (цитиколин) фазах. Следует заметить, что целесообразность комбинации этих средств обусловлена различными точками приложения их фармакологической активности в цепи

патогенетических процессов гипоксически-ишемических последствий нарушений мозгового кровообращения.

Целью нашего исследования стал анализ антиоксидантных эффектов ЭМГПС и цитиколина и сравнение мембранопротективного потенциала комбинации этих препаратов в разных схемах лечения пациентов с хронической ишемией мозга.

Материал и методы

В исследование были включены 40 больных (18 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 54 до 72 лет с хронической ишемией мозга второй стадии, госпитализированные в неврологическое отделение Городской больницы № 56 (г. Москва) в стадии декомпенсации на фоне гипертонического криза и/или нарушения сердечного ритма. Основными этиологическими факторами хронической ишемии мозга были: артериальная гипертония (26%), атеросклероз (22%), сочетание артериальной гипертонии и атеросклероза (44%) и сочетание мерцательной аритмии и атеросклероза (8%). В исследование не включались пациенты с сахарным диабетом, лица, перенесшие инсульт, пациенты со снижением когнитивных функций до уровня деменции и с острыми или обострившимися хроническими воспалительными заболеваниями, а также с онкологическим анамнезом.

После подписания информированного согласия, обследования и верификации диагноза по МКБ-10 (I67.8) больные методом случайной выборки были распределены на три группы в зависимости от схемы лечения. Первая группа (14 человек) в дополнение к базовой схеме, включавшей индивидуально подобранную этиотропную терапию гипотензивными, антиаритмическими, антиагрегантными и антикоагулянтными средствами, получала препарат «Нейрокс» (этилметилгидроксипиридина сукцинат, СОТЭКС, Россия) по 500 мг (5 мл) ежедневно, внутривенно на 200 мл физиологического раствора в течение 14 дней. Вторая группа (13 человек) в дополнение к базовой терапии получала «Нейпилепт» (цитиколин, СОТЭКС, Россия) ежедневно внутривенно струйно по 1000 мг (4 мл) в течение 14 дней. Третья группа (13 человек) в дополнение к базовой терапии получала комбинацию этих препаратов в тех же дозировках. Контролем послужила группа условно здоровых лиц (8 мужчин и 6 женщин) в возрасте от 24 до 42 лет.

Для анализа эффективности лечения использовалась шкала оценки неврологического статуса А.И. Федина и краткая шкала оценки психического статуса MMSE (mini-mental state examination) [5]. В плазме венозной крови определяли активность супероксиддисмутаза, измеряли ее антиокислительную устойчивость и уровень тиоловых (SH) групп для оценки количества глутатиона в плазме.

Активность супероксиддисмутаза определяли при помощи стандартного набора (кат. № 706002, США). За

единицу принималось количество фермента, необходимое для проявления 50 % дисмутации супероксидного радикала. Активность фермента стандартизовали с использованием цитохрома С и ксантин оксидазы.

Для изменения антиокислительных свойств плазмы было использовано водорастворимое азосоединение, которое претерпевает термоиндуцированную деградацию с образованием пероксильных радикалов. Перехват данных радикалов антиоксидантами отражается на степени тушения хемилюминесценции [15]. Исследование выполняли при комнатной температуре на хемилюминометре SmartLum 1200 (Interoptika-S, Россия) при постоянном перемешивании образца. Стандартный образец содержал 10 мМ боратного буфера (рН 10), 10 мкМ люминола, 100 мкл плазмы разбавленной в 100 раз, 10 мкМ водорастворимого азоинициатора 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида. Объем пробы – 1000 мкл. Реакцию запускали добавлением через диспенсер 10 мкМ ААРН. Измеряли интегралы спектра хемилюминесценции, степень тушения хемилюминесценции рассчитывалась как отношение ее интеграла в присутствии плазмы к величине интеграла хемилюминесценции в контроле. Длительность измерения – 10 мин.

Содержание SH-групп, которое отражает концентрацию восстановленного глутатиона [6], определяли спектрофотометрическим методом, измеряя оптическую плотность при 412 нм [13] на приборе Shumadzu UV-1700 (PharmaSpec).

Для выделения липидов из плазмы крови были использованы следующие реагенты: 0,05 % муравьиная кислота, метиловый спирт, хлороформ, 1М хлорид натрия («Химмед», Россия; Sigma-Aldrich, США). Для построения калибровочного графика и определения липидного фосфора методом Васьяковского использовали дигидрофосфат калия, соляную кислоту (36 %), молибдат натрия, солянокислый гидразин и серную кислоту (Sigma-Aldrich, США). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках с алюминиевой подложкой, силикагель Silica Gel 60 F254 (Merck, Германия) в системах: хлороформ–метанол–аммиак (65:25:5) и хлороформ–метанол–вода (65:25:4). Для проявления пятен использовали фосфорномолибденовую кислоту. Определение липидного фосфора осуществляли с использованием метода Бартлета, модифицированного Васьяковским и Светашевым [8]:

Для построения калибровочного графика применяли стандартный раствор дигидрофосфата калия ($\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Для этого подготавливали два реагента. Один (раствор А) представлял собой смесь концентрированной соляной кислоты, воды, молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и солянокислого гидразина ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \times \text{HCl}$). Данную смесь нагревали в кипящей водяной бане с последующим добавлением серной кислоты и воды. Непосредственно перед определением фосфора готовили второй реагент (раствор Б). Для этого к отобранной аликвоте раствора А добавляли воду и серную кислоту.

Количество фосфолипидов рассчитывали по формулам:

$$x = D/0,15736,$$

где x – количество фосфора, D – плотность, а 0,15736 – постоянная, рассчитанная по калибровочному графику;

$$y = x \times 800/31,$$

где y – количество фосфолипидов.

Для анализа количественного состава фосфолипидов в плазме крови использовали программу Sorbfil TLC. В этой программе определяли площадь пика и рассчитали массу фосфатидилхолина. По полученным значениям строили калибровочные графики для расчета концентраций классов фосфолипидов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6 (StatSoft Corp., США). Для анализа достоверности различий применяли непараметрический критерий Вилкоксона для двух связанных групп. Для анализа различий количественных признаков в трех и более несвязанных группах прибегали к статистическому критерию Краскела–Уоллиса ANOVA, для двух несвязанных групп – критерию Манна–Уитни. Результаты представили в виде боксов, отражающих минимальные и максимальные значения (min–max), медиану (Me), верхние и нижние квартили (Q_{75} и Q_{25}). Достоверными принимали различия при $p \leq 0,05$ [4].

Результаты исследования.

На фоне лечения у пациентов всех групп отмечено снижение количества основных жалоб и общее улучшение состояния. Субъективные положительные изменения подтверждались результатами оценки объективного неврологического статуса по шкале А.И. Федина. Так, отмечено достоверное снижение тяжести клинического синдрома: в 1-й группе – с 53 (Q_{75} – Q_{25} : 60,8–45,2) до 38 (Q_{75} – Q_{25} : 42,3–33,8) баллов, во 2-й группе – с 54 (Q_{75} – Q_{25} : 60,5–47,5) до 34 (Q_{75} – Q_{25} : 41,1–26,9) баллов, в 3-й группе – с 54 (Q_{75} – Q_{25} : 61–45) до 32 (Q_{75} – Q_{25} : 40–27,2) баллов. Достоверных межгрупповых различий по динамике неврологического статуса не выявлено. Улучшение когнитивных функций по шкале MMSE также зарегистрировано во всех группах наблюдения: в 1-й группе – от 24,7 (Q_{75} – Q_{25} : 25,1–24,3) до 26,4 (Q_{75} – Q_{25} : 27,2–25,6) балла, во 2-й группе – от 25,1 (25,4–24,8) до 27,4 (Q_{75} – Q_{25} : 27,5–27,3) балла, в 3-й группе – с 26,1 (Q_{75} – Q_{25} : 26,7–26,4) до 28,2 (Q_{75} – Q_{25} : 28,5–28,3) балла. При этом во 2-й группе динамика результатов была достоверной.

В ходе сравнения трех схем лечения было обнаружено повышение активности супероксиддисмутазы в плазме крови на фоне проводимой антиоксидантной терапии. Однако, если достоверных различий в 1-й и 2-й группах не отмечалось, то в случае комбинированного применения препаратов (3-я группа) регистрировалось достоверное увеличение активности фермента после завершения лечения (рис. 2).

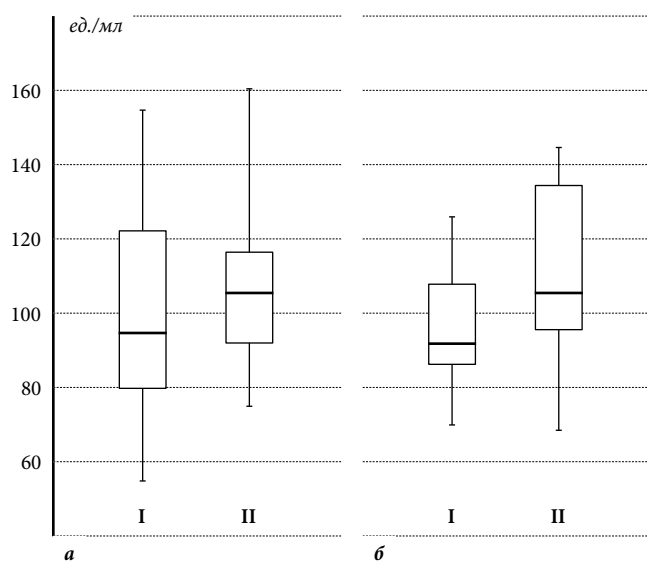


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы в плазме крови пациентов до (I) и после (II) лечения:
а – 1-я группа ($p=0,212$); б – 3-я группа ($p=0,005$).

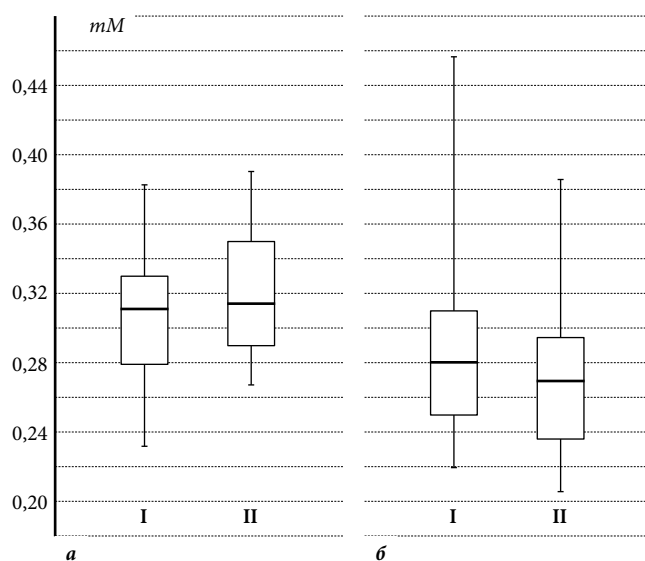


Рис. 4. Уровень общих (несвязанных) SH-групп в плазме крови пациентов до (I) и после (II) лечения:
а – 1-я группа ($p=0,0007$); б – 3-я группа ($p=0,569$).

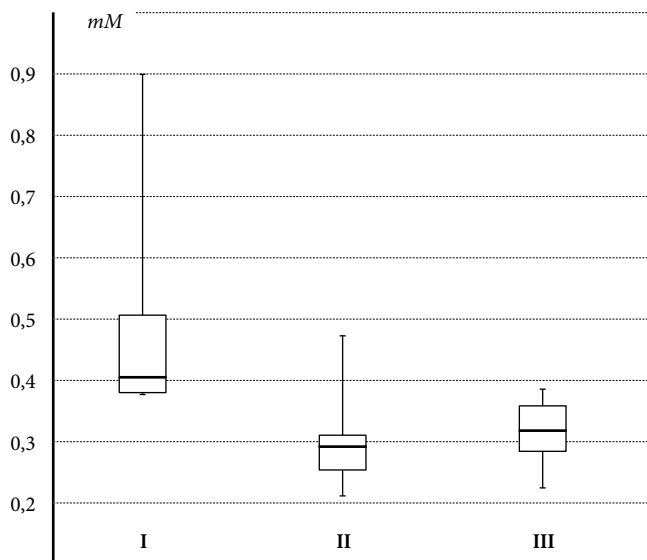


Рис. 3. Уровень общих (несвязанных) SH-групп в плазме крови у пациентов групп сравнения и контроля:
I – условно здоровые лица (контроль); II – 1-я группа, III – 3-я группа.

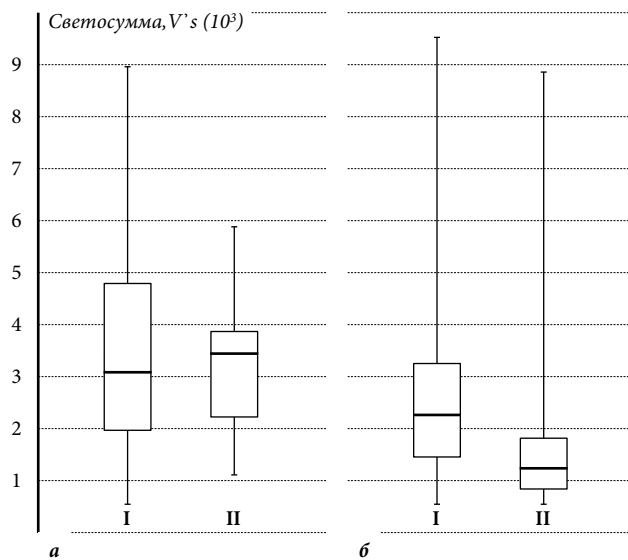


Рис. 5. Антиокислительная устойчивость плазмы крови пациентов до (I) и после (II) лечения:
а – 1-я группа ($p=0,0003$); б – 3-я группа ($p=0,469$).

При сравнении количества общих SH-групп в плазме крови до лечения и у условно здоровых лиц по критерию Краскела–Уоллеса удалось обнаружить достоверные различия (рис. 3). Данный факт позволяет утверждать, что контингент пациентов был подобран корректно: в группах наблюдения количество восстановленных SH-групп достоверно не различается, тогда как в группе условно здоровых лиц исследуемый показатель значимо выше. У пациентов 1-й группы после лечения произошло достоверное увеличение количества восстановленных SH-групп (рис. 4), что свидетельствовало о влиянии препарата не только на активность супероксиддисмутазы, но и на активность другого важного антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы, нивелирующего процессы свободно-радикального окисления.

О согласованности антиоксидантного действия двух препаратов свидетельствуют результаты измерения интегрального критерия оценки функционирования антиоксидантной системы организма – общей антиокислительной устойчивости плазмы. Так, в 3-й группе, получавшей комбинацию препаратов, регистрировалось достоверное снижение хемилюминесценции после курса терапии (рис. 5).

При сравнении трех схем лечения были обнаружены изменения среднего количества липидов в крови пациентов. Так, в 1-й группе, получавшей «Нейрокс» уровни общих липидов и фосфолипидов до и после лечения практически не изменились. Во 2-й группе, получавшей «Нейпилепт», общая масса фосфолипидов несколько возросла, и только в 3-й группе разница этих показателей достигла степени достоверности (табл. 1).

Таблица 1

Количество липидов, экстрагированных из плазмы крови пациентов, принимавших нейропротекторы

Группа	Кол-во липидов, мкг				Кол-во фосфолипидов, мкг			
	до лечения		после лечения		до лечения		после лечения	
	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅
1-я	6,6	5,1-7,2	6,3	5,1-7,8	3,8	3,3-5,3	4,7	3,2-5,7
2-я	6,2	5,3-7,2	7,9	6,8-8,4	4,0	3,5-4,6	4,8	4,5-5,2
3-я	5,8	5,0-6,9	7,8	6,7-8,6	4,1	5,1-7,2	5,1	4,7-5,4

Обсуждение полученных данных

Результаты исследования позволяют утверждать, что «Нейрокс» слабо способствует модификации фосфолипидного состава клеток крови, его применение незначительно изменяет микровязкость их мембран за счет изменения соотношения насыщенных (сфингомиелин) и ненасыщенных (фосфатидилсерин) фосфолипидов, в отличие от 2-й и 3-й групп, где применялся «Нейпилепт» (табл. 2). При монотерапии «Нейроксом» не было зарегистрировано достоверного увеличения количества фосфатидилхолина, что, возможно, связано с небольшой выборкой пациентов. Тем не менее использование этого препарата приводило к небольшому повышению концентрации фосфолипидов в плазме крови, это свидетельствует об увеличении текучести клеточных мембран. При увеличении текучести происходит изменение подвижности мембранных белков, усиление активности поверхностного рецепторного аппарата, а также внутриклеточного транспорта веществ (известно, что фосфатидилсерин считается предпочтительным липидом для Na⁺K⁺-АТФазы).

Следует отметить, что мембраностабилизирующий эффект цитиколина проявляется не только повышенным содержанием фосфатидилхолина, но и восстановлением структурных белков, рецепторов и ферментов на поверхности мембран. В частности, к ним относятся γ -глутамилтранспептидаза, обеспечивающая транспорт мощного антиоксиданта – глутатиона из крови в клетки, что снижает вероятность развития митохондриальной дисфункции. Перехват свободных радикалов глутатионом осуществляется за счет тиоловых групп в его составе. Следовательно, усиленный переход глутатиона из плазмы крови в клетки будет сопровождаться изменением соотношения тиоловых групп в крови и цитоплазме, что и было обнаружено у представителей 2-й группы. У половины пациентов, получающих сочетанную терапию, наблюдалось уменьшение абсолютных значений количества SH-групп в плазме крови (рис. 4).

Комплексная терапия хронической ишемии мозга с применением ЭМГПС и цитиколина демонстрирует двунаправленное антиоксидантное действие этих препаратов: со стороны «Нейрокса» – нарастание активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, со стороны «Нейпилепта» – восстановление структуры поврежденных мембран и увеличение уровня внутриклеточного глутатиона. Полученные результаты связаны с различными точками приложения эффектов данных препаратов. В ходе комбинированного лечения антиоксидантный потенциал лекарственной комбинации увеличивается путем усиления синтеза глутатиона и глутатион-редуктазы (вклад «Нейпилепта») и повышения активности супероксиддисмутазы (вклад «Нейпилепта» и «Нейрокса»), что выразилось в снижении интенсивности хемилюминесценции (рис. 5), в отличие от монотерапии «Нейроксом».

Было зарегистрировано достоверное повышение уровня фосфатидилхолина, а также незначительное изменение концентрации фосфатидилинозитола, сфингомиелина и фосфатидилсерина, что, возможно, связано с недостаточным объемом выборки. Таким образом, комплексная терапия способствовала изменению фосфолипидного спектра крови: увеличение содержания фосфатидилхолина на 10% и снижение уровней фосфатидилинозитола (на 4%), сфингомиелина и фосфатидилсерина (на 3%). Увеличение концентрации мембранного фосфатидилхолина и снижение сфингомиелина способствуют ослаблению активности фосфолипазы А₂ и накоплению церамида. Вследствие этого происходит стабилизация клеточных мембран, что приводит к увеличению активности супероксиддисмутазы и к усилению интенсивности связывания ее с субстратами. Помимо этого, восстановление содержания фосфатидилхолина в биомембранах также способствует аккумуляции на поверхности клеток такого антиоксиданта, как α -токоферол, уменьшающего генерацию гидропероксидов жирных кислот и соответствующих пероксильных радикалов [10].

Следует заметить, что липидный состав плазматических мембран влияет на процессы активации нейтрофилов. Кроме того, изменения микровязкости клеточных мембран способны влиять на рецепторный аппарат. Это сопровождается перестройкой сети мембранных белков, приводящей к повышению подвижности фосфолипидов, что влияет на процессы межклеточной кооперации [11].

Изменения соотношения фракций фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтанолamina

Таблица 2

Качественный состав фосфолипидов в плазме крови пациентов, принимавших нейропротекторы

Группа	Содержание фосфолипидов, %							
	Фосфатидилхолин		Фосфатидилинозитол		Сфингомиелин		Фосфатидилсерин	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
1-я	53	53	20	18	14	13	13	16
2-я	53	60	20	19	14	12	11	11
3-я	55	65	21	17	13	10	11	8

и сфингомиелина в клетках крови пациентов 2-й и 3-й групп, по всей вероятности, указывают на изменения микровязкости клеточных мембран. А это может способствовать изменению функциональной активности липид-зависимых мембранолокализованных ферментов цикла Кребса, дыхательной цепи митохондрий и транспортных АТФаз.

В заключение важно отметить, что поиск оптимального антиоксидантного средства, несмотря на более чем тридцатилетнюю историю изучения роли радикальных процессов в патогенезе различных заболеваний, продолжается. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о терапевтической эффективности комплексного применения нескольких антиоксидантов с различными механизмами действия. Принимая во внимание существующие представления о патогенезе хронической недостаточности мозгового кровообращения, с одной стороны, и требования доказательной медицины к лекарственным препаратам – с другой, перед практическим врачом стоит задача обоснования выбора лекарственных средств, поскольку в специализированной зарубежной литературе и в рекомендациях по лечению неврологических заболеваний все реже и реже всерьез говорят о нейропротективной концепции. Решение проблемы выбора и использования лекарственных средств, на наш взгляд, должно основываться на осмыслении результатов научных исследований и собственном клиническом опыте. Клинические данные и результаты биохимического анализа, полученные в настоящем исследовании, указывают на целесообразность использования ЭМГПС и цитиколина, а также их комбинации в рамках нейропротективной терапии хронической ишемии мозга.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература / References

1. Андреева Н. Н., Мухина И. В., Соловьева Т. И. Влияние мексидола на состав и перекисное окисление липидов миокарда в постреанимационном периоде // *Общая реаниматология*. 2005. Т. 1, № 2. С. 26–30.
Andreyeva N.N., Mukhina I.V., Solovyeva T.I. Postresuscitative effects of Mexidole on myocardial lipid composition and peroxidation // *General Reanimatology*. 2005. Vol. 1, No. 2. P. 26–30.
2. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М.: Медицина, 1989. 368 с.
Bilenko M.V. Ishemicheskiye i reperfusionnyye povrezhdeniya organov. Moscow: Meditsina, 1989. 368 p.
3. Клебанов Г.И., Любичкий О.Б., Васильева О.В. [и др.]. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина // *Вопросы медицинской химии*. 2001. Т. 47, № 3. С. 288–300.
Klebanov G., Liubitskiy O., Vasil'eva O. [et al.]. Antioxidant properties of 3-oxypyridine analogues: mexidol, emoxipin, proxipin // *Voprosy Meditsinskoj Khimii*. 2001. Vol. 47, No. 3. P. 288–300.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: МедиаСфера, 2006. 305 с.
Rebrova O.Yu. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Moscow: Media Sfera, 2006. 305 p.
5. Федин А.И., Румянцева С.А., Миронова О.П., Евсеев В.Н. Применение антиоксиданта «Мексидол» у больных с острым нарушением мозгового кровообращения: методические рекомендации. М.: РГМУ, 2002. 16 с.
Fedin A.I., Rumyantseva S.A., Mironova O.P., Ivseev V.N. Primenenie antioksidanta "Meksidol" u bolnykh s ostrym narusheniem mozgovogo krovoobrashcheniya. Moscow: RGMU. 2002. 16 p.
6. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Определение тиоловых групп в ткани мозга при помощи thioflo-1 // *Биомедицинская химия*. 2004. Т. 50, № 4. С. 390–397.
Yakovlev A.A., Gulyaeva N.V. Determination of thiol groups in brain tissue using thioflo-1 // *Biomedical Chemistry*. 2004. Vol. 50, No. 4. P. 390–397.
7. Andrieu-Abadie N., Gouaze V., Salvayre R., Levade T. Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress // *Free Radical Biology and Medicine*. 2001. Vol. 31, No. 6. P. 717–728.
8. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y. Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms // *J. Lipid. Res.* 1968. Vol. 9. P. 396.
9. Dávalos A., Secades J. Citicoline preclinical and clinical update 2009–2010 // *Stroke*. 2011. Vol. 42, No. 1. P. S36–39.
10. Huang Y., He Q., Zhan L. The effects of CDP-Choline on the improvement of the successful rate of cardiopulmonary resuscitation and post-resuscitation cardiac function // *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2013. Vol. 25, No. 2. P. 80–83.
11. Labrousse S., Freyburger G., Gin H. [et al.]. Changes in phospholipid composition of blood cell membranes (erythrocyte, platelet, and polymorphonuclear) in different types of diabetes – clinical and biological correlations // *Metabolism*. 1996. Vol. 45, No. 1. P. 57–71.
12. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79. P. 1431–1568.
13. Martin K. Some properties of an SH group essential for choline transport in human erythrocytes // *Physiol. J.* 1971. Vol. 213, No. 3. P. 647–664.
14. Rao A.M., Hatcher J.F., Kindy M.S., Dempsey R.J. Arachidonic acid and leukotriene C4: Role in transient cerebral ischemia of gerbils // *Neurochem. Res.* 1999. Vol. 24, No. 10. P. 1225–1232.
15. Wayner D.D., Burton G.W., Ingold K.U. [et al.]. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. Vol. 924, No. 3. P. 408–419.

Поступила в редакцию 13.11.2018.

THE STUDY OF MEMBRANE-PROTECTIVE AND ANTIOXIDANT POTENTIALS OF CITICOLINE AND ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE WITH COMBINED USAGE

E.Yu. Solovyeva, A.N. Karneev, A.V. Chekanov, O.A. Baranova, V.A. Shchelkonogov, K.I. Farakhova, A.I. Fedin

Pirogov Russian National Research Medical University (1 Ostrovitianov St. Moscow 119571 Russian Federation)

Objective: We studied an antioxidant status and phospholipid blood plasma composition of patients with chronic brain ischemia during individual use of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate ('Neurox'), citicoline ('Neipelept').

Methods: The study included 40 patients aged 54–72 y.o. with chronic brain ischemia 2 stage in the decompensating phase. The 1st group (14 patients) took 'Neurox' in addition to a basic regimen, the 2nd group (13 patients) – 'Neipelept', the 3rd group (13 patients) – a combination of these drugs. The control group – 14 healthy people aged 24–42 y.o.

Results: Having used a combination therapy with the drugs 'Neurox' and 'Neipelept', a significant increase of superoxide dismutase activity in blood plasma after the end of treatment was registered. A significant increase of reduced SH-groups number was detected after the treatment with 'Neurox'. Having studied quantitative and qualitative composition of blood phospholipids in patients taking 'Neurox', significant changes in their mass was not detected; meanwhile having used 'Neipelept' and the combinations of these drugs, there was an increase of content and total mass of phospholipids.
Conclusions: Clinical data and results of biochemical analysis signify the applicability of ethylmethylhydroxypyridine succinate and citicoline, and also their combinations as part of neuroprotective therapy of chronic brain ischemia.

Keywords: brain ischemia, neipelept, neurox, phospholipids