

Енергетичний обмін у печінці щурів із паркінсонічним синдромом, індукованим ротеноном, при дії метаніндіазенону

Л.Я. Штанова¹, С.П. Весельський¹, П.І. Янчук¹, О.В. Цимбалюк¹, В.С. Москвіна¹,
О.В. Шабликіна¹, Є.М. Решетнік¹, О.В. Кравченко², В.П. Хиля¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка;

² Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ; e-mail: shtanova@ukr.net

Хвороба Паркінсона (ХП) симптоматично характеризується моторними порушеннями в організмі людини, які пов'язують із дегенерацією дофамінергічних (ДА) нейронів чорної субстанції середнього мозку. Припускають, що мітохондріальна дисфункція ДА-нейронів є однією з можливих причин їхньої загибелі та розвитку такої патології. Останнім часом нейропротекторні властивості щодо цього типу нейронів головного мозку було виявлено у препаратів бензодіазепінового ряду. Метою нашого дослідження було оцінити вплив нового похідного бензодіазепіну метаніндіазенону на енергетичний обмін у печінці щурів із паркінсонічним синдромом (ПС), викликаним дією ротенону. У зразках жовчі щурів з ПС методом тонкошарової хроматографії визначали концентрацію АТФ, АДФ, АМФ, гіпоксантину та ксантину. Одержані результати свідчать, що під впливом ротенону вміст АТФ у жовчі зменшився на 40%, а АМФ, ксантину та гіпоксантину, навпаки, збільшувався на 87,5, 55,6 та 25% відповідно щодо контрольних значень. Співвідношення АМФ/АТФ, яке є важливим показником функціонального стану мітохондрій, під впливом ротенону зростало на 200% порівняно з контролем. Метаніндіазенон у дозі 1 і 2 мг/кг нормалізував усі досліджувані нами параметри пуринового обміну в жовчі дослідних щурів. Таким чином, він значно покращував метаболізм пуринів у печінці щурів з ПС, індукованим ротеноном, що вказує на нормалізацію у функціонуванні мітохондрій у гепатоцитах. Цей препарат може розглядатись як потенційний додатковий засіб при лікуванні ХП і, можливо, інших нейродегенеративних захворювань, пов'язаних із порушенням функцій мітохондрій.
Ключові слова: паркінсонічний синдром; ротенон; метаніндіазенон; жовч; пурини.

ВСТУП

Хвороба Паркінсона (ХП) – одна з найпоширеніших хронічних і прогресуючих нейродегенеративних патологій, що характеризується загибеллю меланіновмісних нейронів у substantia nigra pars compacta (SNpc) середнього мозку, утворенням білкових α -синуклеїнових включень у нейронах, або так званих тілець Леві [1]. Нейрони компактної частини чорної речовини посилають свої проєкції з середнього мозку до двох ядер переднього мозку: хвостатого ядра і лущини, які разом називають смугастим тілом. Оскільки ці нейрони використовують

дофамін як нейромедіатор, то їхня дегенерація призводить до глибокого його виснаження в смугастому тілі [2]. Останнє, як відомо, координує декілька когнітивних функцій, а також рухи та їхнє планування. Внаслідок таких патологічних змін втрачається м'язовий контроль, тому у пацієнтів з ХП, зазвичай, спостерігаються рухові розлади: брадикінезія, тремор, ригідність, постуральна нестабільність. З іншого боку, ця патологія спричиняє немоторні симптоми, зокрема порушення пам'яті, деменцію, депресію, погіршення роботи травної системи тощо [1]. У 2016 р. число пацієнтів з ХП у всьому світі сягало близько 6,1 млн, а поширеність

хвороби зростає з віком [3]. Незважаючи на те, що ХП вперше була описана понад два століття тому, загальноприйнятих методів лікування, які дають змогу запобігти, зупинити або хоча б уповільнити прогресуючу нейродегенерацію, досі не існує. Проте впродовж останніх десятиліть відбувся значний прогрес у розумінні молекулярної основи нейродегенерації при ХП. Патологічній ХП сприяють різні генетичні, метаболічні та екологічні фактори, у тому числі окисний стрес, агрегація аномальних білків та мітохондріальна дисфункція, кожен з яких був запропонований як можлива терапевтична мішень [1]. Основою лікування ХП наразі є використання дофамінергічної терапії, яка дає можливість тимчасово усунути рухові симптоми захворювання. Для корекції немоторних симптомів ХП у клінічній практиці використовують класичні бензодіазепінові препарати [4].

Нещодавно з'явилися дані про застосування нових підходів до лікування ХП. На базі 1,5-бензодіазепіну дві групи дослідників розробили нові засоби, які на різних моделях ХП справляли на нейрони мозку захисні ефекти, зокрема, антиоксидантний, антиапоптотичний, антизапальний, відновлюючи окрім усього функціональний стан мітохондрій як *in vivo* [5, 6], так і *in vitro* [7].

Метою цієї роботи було з'ясування змін біоенергетичних процесів у печінці щурів з ротеноновою моделлю ПС дослідженням вмісту АТФ і її основних метаболітів у жовчі та можливості модуляції цих змін за допомогою метаніндіазенону.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили згідно з чинними міжнародними вимогами та нормами гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986 р., Закон України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV), відповідно до рішення Комітету з біологічної етики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського

національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3 від 9 квітня 2009 р.). У роботі були використані: ротенон, диметилсульфоксид фірми “Sigma” (США). Досліджуваний препарат – 4-(4-метокси-3-метилфеніл)-2,5-дигідро-1Н-бензо[d][1,2]діазепін-1-он – метаніндіазенон був синтезований у нашій лабораторії. Елементарний його аналіз проводили в аналітичній лабораторії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ [8]. Для відбору біологічного матеріалу (жовчі) дослідних тварин наркотизували тіопенталом натрію (“Київ-медпрепарат”, Україна). Дослідження проводили в гострому експерименті на 60 самцях щурів материнської лінії Вістар, отриманих з Інституту фармакології і токсикології АМН України. Маса тварин була в межах 300–350 г, вік – 14 тиж. Протягом експериментального періоду тварини перебували в стандартних умовах: за вологості середовища 55–60%, з контрольованою температурою $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-годинним циклом світло/темрява, вільним доступом до водопровідної води та комерційних продуктів харчування. На початку експерименту тварин випадковим чином розподілили на 6 груп по 10 у кожній. До 1-ї контрольної групи ввійшли тварини, які отримували рафіновану соняшникову олію (1 мл/кг); тваринам 2-ї групи вводили ротенон (2 мг/кг); 3-ї – ротенон і 1%-й розчин диметилсульфоксиду (1 мл/кг); 4-ї, 5-ї, 6-ї групи – після введення ротенону метаніндіазенон в дозі 0,5, 1 і 2 мг/кг відповідно. Ротенон, як ліпофільну сполуку, суспендували в рафінованій соняшниковій олії безпосередньо перед використанням і вводили інтраперитоніально в дозі 2 мг/кг за добу [9]. Процедура введення тривала впродовж 4 тиж, початок проведення її в один і той самий час (10:00). Після завершення 28-денного терміну шурам припиняли введення ротенону, натомість починали давати досліджуваний препарат метаніндіазенон, дози вказані вище. Суспензію метаніндіазенону в 1%-му розчині диметилсульфоксиду готували в день експерименту, безпосередньо

перед використанням і вводили одноразовими внутрішньоочеревинними ін'єкціями. Доза препарату метаніндіазенон була визначена на основі найнижчої дози інших нейропротективних препаратів, які виявились ефективними.

У жовчі визначали концентрацію таких сполук (у мг%): АТФ, АДФ, АМФ, гіпоксантину та ксантину. Кількісне та якісне дослідження компонентів аденілової системи проводили методом тонкошарової хроматографії. Для цього до 1,8 мл 0,8N розчину хлорної кислоти (HClO_4) додавали 0,2 мл жовчі. І жовч, і HClO_4 попередньо охолоджували до 0°C . Хлорну кислоту використовували для осадження аденілових нуклеотидів: АТФ, АДФ, АМФ, гіпоксантину і ксантину. Отримані перхлоратні екстракти центрифугували впродовж 15 хв на центрифугі ОРn-3 U42 при 1500 об/хв і нейтралізували K_2CO_3 до рН 7,0. Після центрифугування в зазначених вище умовах супернатант збирали і певні аліквоти наносили на хроматографічні пластини. Розділення та кількісне визначення аденілових нуклеотидів на пластиних «Силуфол» UV-254 проводили за методом Майданюка та співавт. [10]. Пряму денситометрію пластин у відбитому світлі здійснювали на високошвидкісному сканері денситометра CS-920 «Shimadzu» (Японія) у напрямку руху розчинника за довжини хвилі 260 нм. Вміст досліджуваних сполук у хроматографічних плямах визначали за калібрувальними кривими площі плям за кількістю нанесених хроматографічно чистих препаратів АТФ, АДФ, АМФ, гіпоксантину, ксантину.

Результати оцінювали за допомогою параметричного одностороннього методу ANOVA, а також у поєднанні з тестом Тьюкі для попарного порівняння. Значення $P < 0,05$ вважали вірогідними; непараметричний метод Kruskal Wallis ANOVA, а також у поєднанні з тестом Манна-Уїтні для попарного порівняння з поправкою Бонферроні та значеннями $P < 0,01$ вважали вірогідними. Статистичний аналіз проводили за допомо-

гою програми Origin Pro 8,0, діаграми склали за допомогою програми Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У представленій роботі дофамінергічну нейродегенерацію у щурів викликали введенням ротенону протягом 28 днів. Біохімічний аналіз жовчі виявив кількісні зміни пуринових метаболітів, пов'язані з розвитком ПС. Зокрема, у щурів контрольної групи концентрація АТФ у жовчі становила $9,2 \pm 1,1$ мг%. Після 28-добового введення ротенону цей показник у дослідних тварин зменшився щодо контролю на 40% ($P < 0,001$). У щурів 3-ї групи вміст АТФ був на 20,7% ($P < 0,001$) меншим щодо контролю, але на 64% ($P < 0,001$) більшим, ніж у групі тварин, яким вводили ротенон. У тварин із ПС, яким вводили метаніндіазенон у дозі 0,5 мг/кг, концентрація АТФ була меншою від контрольних значень на 19,6% ($P < 0,001$), а при дозах метаніндіазенону 1 і 2 мг/кг не відрізнялася від контрольних значень. Вміст АДФ у жовчі після ін'єкцій ротенону сягав норми у щурів усіх груп, тоді як концентрація АМФ у 2-й та 3-й групах перевищувала контрольні значення на 87,5% ($P < 0,001$). Застосування метаніндіазенону зменшувало вміст цієї речовини до контрольних значень. Вміст гіпоксантину в жовчі щурів з ПС зріс з $0,9 \pm 0,04$ мг% у контрольній групі, до $1,4 \pm 0,06$ мг% у 2-й групі (на 55,6%; $P < 0,001$). До нормальних значень цей показник повернувся в групах щурів з ПС, яким метаніндіазенон вводили в дозах 1 і 2 мг/кг. Концентрація ксантину в жовчі щурів контрольної групи сягала $0,8 \pm 0,03$ мг%. Уведення ротенону викликало підвищення вмісту цієї сполуки на 25% ($P < 0,01$). У щурів 3-ї групи вміст ксантину був меншим від контролю на 12,5% ($P < 0,05$), а під впливом метаніндіазенону кількість цієї сполуки сягала контрольних значень. Співвідношення АМФ/АТФ зросло щодо контролю в 2-й групі на 200%, у 3-й – на 162,5% ($P < 0,001$), у 4-й – на 20% ($P < 0,05$).

У 5-й та 6-й групах цей показник повернувся до контрольних значень (таблиця).

Енергетичний обмін залежить від функції мітохондрій, а виробництво АТФ помітно змінюється при ХП, тому порушення цієї функції можна досліджувати через визначення вмісту АТФ чи пов'язаних з нею метаболітів [11]. Пуриновий обмін – важлива основа енергетичного обміну, а компоненти аденілової системи є одними з ключових метаболітів останнього. Система АТФ-АДФ-АМФ відіграє особливу роль у біоенергетиці, оскільки у всіх живих організмах АТФ виступає як депо для зберігання і перенесення енергії. Його синтез відбувається відповідно до енергетичних потреб клітини завдяки реакціям фосфорилування, що можуть здійснюватися в цитоплазмі (субстратне фосфорилування) або в мітохондріях (окисне фосфорилування). Ефективність окисного фосфорилування залежить від надходження відновних еквівалентів в електронно-транспортний ланцюг і активності окремих ферментів або ферментних комплексів. Комплекс I є відповідальним за адаптивні зміни та ефективність окисного фосфорилування в фізіологічних умовах [12]. Головний мозок характеризується високим рівнем метаболізму, через що потребує багато енергії для здійснення своїх функцій

і виживання. Зниження вироблення АТФ у певних ділянках ЦНС може призвести до ушкодження нейронів в уражених регіонах, і, таким чином, спричинити ішемічні або дегенеративні зміни. У нейродегенеративному процесі ХП одну з ключових ролей відіграє загибель нейрональних мітохондрій, які визначають біоенергетичний статус клітини. Ось чому гомеостатичні механізми, що забезпечують здоровий пул мітохондрій, є ключем до функціонування та цілісності нейронів. Для з'ясування механізму нейродегенерації при ХП та розробки методів лікування, що уповільнюють або зупиняють прогрес цієї хвороби, використовують експериментальні моделі, що демонструють ознаки дофамінергічної деіннервації, характерної для ХП. Для таких досліджень часто використовують ротенонову модель ПС, оскільки, як було встановлено, нейротоксин ротенон викликає нейропатологічні зміни не лише в ЦНС, а й у периферичній нервовій системі у тварин [13]. Слід відмітити, що за допомогою цих моделей було виявлено потенційні патогенетичні та патофізіологічні механізми ХП людини. Ротенон є специфічним інгібітором комплексу I мітохондріального дихального ланцюга, блокада якого призводить до збільшення витоку електронів, і, отже, збільшення утворення супероксиду, який викликає смерть

Вплив метаніндіазенону на вміст АТФ та її основних метаболітів у жовчі щурів з ротеновою моделлю паркінсонічного синдрому (M ± SD; n = 10)

Схема досліджу	АТФ	АДФ	АМФ	АМФ/АТФ	Гіпоксантин	Ксантин
Контроль	9,2±0,4	1,7±0,28	0,8±0,12	0,08±0,003	0,9±0,13	0,8±0,09
Ротенон	5,5±0,57***	1,6±0,28	1,4±0,21***	0,23±0,034***	1,4±0,18***	1,0±0,15 **
Ротенон і 1%-й диметилсульфоксид	7,3±0,7***	1,5±0,23	1,5±0,27***	0,21±0,029***	1,1±0,16*	0,9±0,12
Ротенон і метаніндіазенон						
0,5 мг/кг	7,4±0,53***	1,6±0,26	0,9±0,17	0,11±0,032	1,1±0,17	0,75±0,13
1 мг/кг	8,8±0,95	1,6±0,14	0,8±0,12	0,09±0,01	0,9±0,15	0,73±0,09
2 мг/кг	9,0±0,87	1,65±0,18	0,8±0,12	0,08±0,012	0,8±0,17	0,75±0,12

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 порівняно з контрольними щурами.

клітини. Як було показано раніше, хронічне системне протягом 28 днів уведення ротенону щурам [14] або хронічне пероральне введення мишам [15] призводило до вибіркової втрати нігральних дофамінергічних (ДА)-нейронів і накопичення нейрональних α -синуклеїнових включень, а також поведінкових та рухових порушень, подібних до ПС [16]. Ротенонові моделі ПС привернули найбільшу увагу після того, як Greenamure та співавт. [17] повідомили, що хронічний вплив ротенону може відтворити гістологічні, нейрохімічні, поведінкові та нейропатологічні особливості ПС. Крім цього, було показано, що ротенон індукує нейропатологічні зміни не лише в ЦНС (втрата ДА-нейронів у SNpc, збільшення агрегатів α -синуклеїну в цих нейронах та дорсальному руховому ядрі блукаючого нерва, ураження нервових закінчень у смугастому тілі), а й у кишечнику та міжм'язових сплетеннях [18]. Порушення енергетичного обміну та зниження вмісту АТФ є загальними рисами ХП. Як було встановлено, ротенон викликає мітохондріальну дисфункцію не лише в нейронах, але й в клітинах периферичних органів, зокрема в м'язах [19] та печінці, хоча такі ефекти ще мало досліджені. У печінці він послаблював здатність гепатоцитів до синтезу АТФ, знижував активність ферменту АТФ-синтази в мітохондріях і підвищував потенціал мітохондріальної мембрани, що спричиняло пошкодження мітохондрій гепатоцитів щурів окисним стресом [20]. Зростає обсяг доказів того, що ХП – це захворювання не лише головного мозку, а й системний метаболічний синдром із порушенням клітинної енергетики та функцій у периферичних тканинах. Тому можна вважати, що порушення продукції мітохондріального АТФ у печінці чи інших периферичних тканинах може бути важливим інструментом для розуміння механізмів розвитку ПС та винайдення способів впливу на ці механізми. Наші результати збігаються з даними Wang та співавт. [21], які спостерігали зниження синтезу АТФ на тлі введення ротенону. Вони пояснювали їх

мітохондріальною дисфункцією, викликану підвищенням мембранного потенціалу мітохондрій та окисним стресом. При цьому вміст АМФ у жовчі, а також гіпоксантину, навпаки, суттєво зростали на 87,5 та 55,6% відповідно. Вміст ксантину також збільшувався, але лише на 25%, що може свідчити про труднощі з перетворенням останнього на сечову кислоту, а гіпоксантину – в ксантин. Розпад пуринових нуклеотидів включає реакції відщеплення фосфатного залишку, рибози й аміногрупи у вигляді аміаку, що призводить до утворення із АМФ гіпоксантину, а із ГМФ – ксантину. Фермент ксантиноксидаза каталізує окиснення гіпоксантину в ксантин і ксантину – в сечову кислоту, яка є кінцевим продуктом розпаду пуринів. Отже, ми бачимо, що перетворення порушуються на декількох етапах обміну пуринів. Можливо, це пов'язано з пригніченням при ПС активності ферментів, які каталізують відповідні реакції в аденіловій системі. Yakhine-Dior та співавт. [22] спостерігали, що у плазмі пацієнтів з ХП збільшувався вміст гіпоксантину, а в плазмі мишей з ПС – як гіпоксантину, так і ксантину. Механізми, що призводять до таких змін, доки не відомі. Згідно з нашими результатами, співвідношення АМФ/АТФ, яке є важливим маркером функціонального стану мітохондрій, у жовчі тварин 2-ї групи перевищувало контрольні значення на 200%, а при застосуванні метаніндіазенону (1 і 2 мг/кг) цей показник повністю нормалізувався, як і вміст усіх компонентів аденілової системи.

Отже, з одного боку, існує прямий і очевидний зв'язок між порушеннями функціонування ЦНС і розвитком ХП, а з іншого – це захворювання пов'язане з розладом метаболізму і в периферичних органах, зокрема в печінці. Нейрони значною мірою залежать від цілісності мітохондрій через їхні складні сигнальні властивості, пластичність і збудливість, а також забезпечення виживання клітин протягом тривалого часу. Тому підтримання пулу здорових мітохондрій, здатних задовольнити біоенергетичні

потреби нейрона, має вирішальне значення; це досягається внаслідок підтримання ретельного балансу між мітохондріальним біогенезом, мітохондріальним транспортом, мітохондріальною динамікою та мітофагією. Обмеження продукції АТФ пов'язують із загальною мітохондріальною дисфункцією, яка часто спостерігається при різних захворюваннях, у тому числі й нейродегенеративних, типу ХП. Ротенон може викликати колапс мембранного потенціалу мітохондрій та їхню дисфункцію. Остання зумовлює зниження окисного фосфорилування, виснаження АТФ і утворення активних форм кисню. Таким чином, здатність мітохондрій синтезувати АТФ і споживати кисень у відповідь на потребу клітини в енергії є надійною ознакою їхнього функціонального стану, відображаючи життєздатність клітини в цілому. У тканинах з високим споживанням енергії, таких як печінка, нирки, серце та мозок, мітохондрії є основним джерелом клітинного АТФ. Тому не дивно, що вони становлять приблизно 22% клітинного об'єму в нирках і печінці [23]. Сповільнення втрати ДА-нейронів та покращення когнітивних здібностей спостерігали у гризунів з ПС після лікування їх препаратами, які підвищують вміст АТФ у мозку [24]. Як вже згадувалося вище, для лікування немоторних симптомів ХП застосовують класичні бензодіазепіни. Ці сполуки досить ефективні в лікуванні тривоги – немоторного симптому ХП. Вони є класом психоактивних препаратів, які посилюють дію ГАМК на рецептор GABA_A, що призводить до седативного, снодійного, анксиолітичного, протисудомного та міорелаксуючого ефектів [25]. Нещодавно у бензодіазепінів виявили нові властивості при лікуванні ПС, у тому числі й при дії ротенону. Fonseca-Fonseca та співавт. [5] на основі 1,5-бензодіазепіну створили родину препаратів, які добре себе проявили у захисті ДА-нейронів на різних моделях ПС. Зокрема, було встановлено, що один із представників цього сімейства, а саме JM-20 – гібридна молекула бензодіазепіну-дигідропіридину –

чинить антиоксидантний, антиапоптичний, антизапальний вплив. Препарат захищає мітохондрії як нейронів, так і печінки щурів від ушкодження, спричиненого дією ротенону. У тварин з ротеновою моделлю ПС він зменшував окисне ураження в нігростріарній зоні та навіть інгібував утворення форм, агрегованих з α -синуклеїном [26]. Точні механізми, що лежать в основі індукованого JM-20 зниження окисного стресу, поки не встановлені. Іншими дослідженнями [27] було показано, що ротенон викликає деполяризацію мітохондрій, у зв'язку з чим порушується регулювання Ca^{2+} . Надмірне поглинання Ca^{2+} мітохондріями викликає неселективну пермеабілізацію внутрішньої мітохондріальної мембрани, що сприяє їхньому набухання і розсіюванню мембранного потенціалу внаслідок масивного витоку протонів. Було зроблено припущення, що JM-20 покращує функцію мітохондрій саме через нормалізацію мембранного потенціалу та транспорту Ca^{2+} через мембрану [5]. В експериментах *in vitro* препарати іншого сімейства – 1,5-бензодіазепін-2(3H)-ону так само захищали нейрони в умовах окисного стресу, покращуючи функціональний стан мітохондрій зі значним відновленням їхнього мембранного потенціалу. Більшість із них також продемонстрували відсутність цитотоксичності щодо клітинних ліній людини SH-SY5Y та НерG2 на таких моделях ПС, як 6-OHDA та MPP⁺. Заслуговує на увагу нейропротекторна активність, виявлена в нейроноподібних диференційованих клітинах SH-SY5Y під впливом окисного стресу. Таким чином, це нове сімейство 1,5-бензодіазепін-2(3H)-онів, яке включає 23 препарати з властивостями, подібними до лікарських засобів, є гарною відправною точкою для подальших досліджень, які дають змогу з'ясувати механізм їхньої дії та терапевтичні можливості. Розробники пропонують такі сполуки, як 4-феніл-1H-1,5-бензодіазепін-2(3H)-он та 4-(3,4,5-триметоксифеніл)-1H-1,5-бензодіазепін-2(3H)-он використовувати в дослід-

женнях *in vitro* та *in vivo*, де вони можуть продемонструвати свій потенціал як нові терапевтичні агенти не лише при ПС, але й при інших нейродегенеративних патологіях, в яких може бути задіяний окисний стрес [7].

Ми розробили свою родину препаратів на основі бензодіазепіну, представником якого є метаніндіазенон. На ротеноновій моделі ПС у щурів раніше було показано, що один із них, а саме, 2,3-діазепін покращував тканинне дихання печінки і її жовчогітну та жовчопродуктивну функцію [28], інший – діазепінон відновлював вміст АТФ у жовчі та покращував ліпідний обмін у печінці [10]. У нашій попередній роботі встановлено, що метаніндіазенон відновлював концентрацію АТФ у крові щурів з ПС, викликаним дією ротенону, нормалізував вміст у плазмі крові фосфоліпідів, холестерину та вільних жирних кислот, а також покращував рухову поведінку в умовах «відкритого поля», відновлював втрачену масу тіла, повністю запобігав смертності тварин [29].

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження допомогли встановити метаболічні зміни у печінці, яка є органом із високим рівнем метаболізму, на ротеноновій моделі ПС у щурів. Виявлено значні відхилення від норми в пуринових шляхах, які можуть потенційно позначатися на патологічному характері цих змін. Новий член створеної нами родини препаратів на основі бензодіазепінів метаніндіазенон в дозах 1 і 2 мг/кг має значний коригувальний вплив на енергетичний обмін в гепатоцитах у щурів з ПС, викликаним дією ротенону. Виявлені нами на моделі ПС у щурів зміни метаболізму пуринів у периферичних тканинах відкривають нові можливості для кращого розуміння етіології цього неврологічного розладу. Наші результати свідчать про протективний потенціал метаніндіазенону при порушенні функцій мітохондрій у гепатоцитах, тому його можна рекомендувати як допоміжний препарат для лікування ХП.

Робота виконана в рамках НДР кафедри органічної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка на тему «Перспективні молекулярні засоби на основі природних і синтетичних (карбо) гетероциклів для вирішення проблем хімії, медицини, промисловості, № 0119U100340 (2019-2021).

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

L.Ya. Shtanova¹, S.P. Veselsky¹, P.I. Yanchuk¹, O.V. Tsybalyuk¹, V.S. Moskvina², O.V. Shablykina¹, E.M. Reshetnik¹, O.V. Kravchenko², V.P. Khilya¹

ENERGY METABOLISM IN THE LIVER OF RATS WITH ROTENONE-INDUCED PARKINSONIAN SYNDROME UNDER THE INFLUENCE OF METHANINDIAZENONE

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv;

² Bogomolets National Medical University, Kyiv;

e-mail: shtanova@ukr.net

Parkinson's disease (PD) is symptomatically characterized by motor disorders in the human body, which are associated with the degeneration of dopamine neurons in the substantia nigra of the midbrain. It is widely recognized that mitochondrial dysfunction occurs in dopaminergic neurons, leading to their death and the development of this pathology. Recently, benzodiazepine derivatives have been found to have a neuroprotective effect against damage of dopaminergic neurons in an experimental model of Parkinsonian syndrome (PS). The aim of this study was to investigate the effect of a novel molecule, named methanidiazene, on energy metabolism in the liver of rats induced by rotenone. To achieve the set goal, the concentration of ATP, ADP, AMP, hypoxanthine and xanthine were determined in the bile samples of rats with PS by the method of thin-layer chromatography. The obtained data indicate that under the influence of rotenone compared to the control values the content of ATP in bile decreased by 40%, while the levels of AMP, xanthine and hypoxanthine, on the contrary, increased by 87,5%, 55,6%, and 25%, respectively. Our findings suggested that the ratio of AMP/ATP, which is an important indicator of the functional state of mitochondria, under the influence of rotenone increased by 200% compared to the control. Methanidiazene in a dose of 1,0 and 2,0 mg/kg normalized all studied parameters of purine metabolism. The

presented results show that methanindiazene significantly improves purine metabolism in the liver of rats with PS induced by rotenone, indicating the normalization of mitochondrial function in hepatocytes. Thus, methanindiazene may be recommended for clinical trials regarding its use in combination with other drugs to treat Parkinson's disease and possibly other neurodegenerative diseases, in which mitochondrial dysfunction occurs.

Key words: rotenone; Parkinsonian syndrome; liver; bile; purine metabolism.

REFERENCES

- Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clin Geriatr Med.* 2020;36(1):1-12.
- Jeong SH, Park CW, Lee HS, Kim YJ, Yun M, Lee PH, et al. Patterns of striatal dopamine depletion and motor deficits in de novo Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2023;130(1):19-28.
- Dorsey ER, Nichols EA, Abbasi N, Abd-Allah F, Abdelalim A. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: A systematic analysis for the global burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2018;17(11):939-53.
- Hadi F, Agah E, Tavanbakhsh S, Mirsepassi Z, Mousavi SV, Talachi N, et al. Safety and efficacy of melatonin, clonazepam, and trazodone in patients with Parkinson's disease and sleep disorders: a randomized, double-blind trial. *Neurol Sci.* 2022;43(10):6141-8.
- Fonseca-Fonseca L, Wong-Guerra M, Ramirez-Sánchez J, Montano-Peguero Y, Padrón Yaquis A, Rodríguez A, et al. JM-20, a novel hybrid molecule, protects against rotenone-induced neurotoxicity in experimental model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2019b;690:29-35.
- Fonseca-Fonseca LA, da Silva VDA, Wong-Guerra M, Ramirez-Sánchez J, Yaquis ASP, Ochoa-Rodríguez E, et al. JM-20 protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in models of Parkinson's disease: Mitochondrial protection and antioxidant properties. *Neurotoxicology.* 2021;82:89-98.
- Ortiz de Zárate A, Pérez-Torralba M, Isidro I B, López C, Claramunt RM, Martínez-Casanova D, et al. 1,5-Benzodiazepin-2(3H)-ones: in vitro evaluation as antiparkinsonian agents. *Antioxidants.* 2021;10: 1584.
- Shablykina O, Krekhova O, Konovalenko A, Moskvina V, Khilya V. Interaction of 3-pyridyl and 3-(imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl) isocoumarins with hydrazine. *Dopov Nac Akad Nauk Ukr.* 2018;(12):71-8.
- Zeng X, Geng W, Jia J. Neurotoxin induced animal models of Parkinson disease: Pathogenic mechanism and assessment. *ASN Neuro.* 2018;10:1759091418777438.
- Shtanova LYa, Yanchuk PI, Veselsky SP, Tsybalyuk OV, Vovkun TV, Moskvina VS, et al. Corrective effects of benzodiazepine derivative – diazepam on purine and lipid metabolism in the liver of rats with Parkinson's disease. *Fiziol Zh.* 2021;67(4):64-75.
- Mantle D, Hargreaves IP. Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative disorders: role of nutritional supplementation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12603.
- Okoye CN, Koren SA, Wojtovich AP. Mitochondrial complex I ROS production and redox signaling in hypoxia. *Redox Biol.* 2023;67:102926.
- Miyazaki I, Asanuma M. The rotenone models reproducing central and peripheral features of Parkinson's disease. *Neuro Sci.* 2020;1:1.
- Betarbet R, Sherer T, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A, Greenamyre J. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000;3:1301-6.
- Inden M, Kitamura Y, Abe M, Tamaki A, Takata K, and Taniguchi T. Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 Mice. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(1) 92-6.
- Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol.* 2011;164:1357-91.
- Greenamyre J T, Betarbet R, Sherer TB. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism and related disorders.* 2003;9:S59-S64.
- Miyazaki I and Asanuma M. The rotenone models reproducing central and peripheral features of Parkinson's disease. *Neuro Sci.* 2020;1(1),1-14.
- Cai R, Zhang Y, Simmering JE, Schultz JL, Li Y, Fernandez-Carasa I, et al. Enhancing glycolysis attenuates Parkinson's disease progression in models and clinical databases. *J Clin Invest.* 2019;129(10):4539-49.
- Reyes JF, Ekmark-Lewen S, Perdiki M, Klingstedt T, Hoffmann A, Wiechec E, et al. Accumulation of alpha-synuclein within the liver, potential role in the clearance of brain pathology associated with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9:46.
- Wang H, Huo M, Jin Y, Wang Y, Wang X, Yu W, Jiang X. Rotenone induces hepatotoxicity in rats by activating the mitochondrial pathway of apoptosis. *Toxicol Mech Method.* 2022;32(7):510-17.
- Yakhine-Diop S, Morales-García J, Niso-Santano M, González-Polo R, Uribe-Carretero E, Martínez-Chacon G, et al. Metabolic alterations in plasma from patients with familial and idiopathic Parkinson's disease. *Aging (Albany NY).* 2020;12(17):16690-708.
- Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol.* 1977; 72 (2), 441-55.
- Weber MA, Sivakumar K, Tabakovic EE, Oya M, Aldridge GM, Zhang Q, Simmering JE, Narayanan NS. Glycolysis-enhancing α 1-adrenergic antagonists modify cognitive symptoms related to Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2023;9(1):32.
- Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM, Kim JJ, and Hibbs RE. Structure of a human synaptic GABA-A receptor. *Nature.* 2018;559(7712):67-72.

26. Santos CC, Cardim-Pires TR, Shvachiy LL, Fonseca-Fonseca A, Muñoz P. JM-20, a benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule, inhibits the formation of alpha-synuclein-aggregated species. *Neurotoxic Res.* 2022; 40(15): 2135-47.
27. García-Aguilar R, Ortega A, López-Bayghen E, Ramírez-Martínez L, Rodríguez-Campuzano A, Murillo-González F, et al. Kynurenine attenuates mitochondrial depolarization and neuronal cell death induced by rotenone exposure independently of AhR-mediated parkin induction in SH-SY5Y differentiated cells. *Neurotoxicology.* 2023; 99:282-91.
28. Khilya VP, Yanchuk PI, Shtanova LYa, Veselsky SP, Vovkun TV, Tsybalyuk OV, et al. The evaluation of 2.3-diazepine influence on tissue respiration of the liver and its exocrine function in rats with a rotenone model of Parkinson's disease. *Biopolymer Cell.* 2019; 35(5):356-70.
29. Shtanova L, Yanchuk P, Veselsky S, Tsybalyuk O, Vovkun T, Moskvina V, et al. Purine and lipid metabolism in rats with a rotenone model of Parkinson's disease under the influence of methanindiazepine. *Fiziol Zh.* 2022;68(6):18-30.

*Матеріал надійшов
до редакції 08.04.2024*