

ВЛИЯНИЕ РИБОЗЫ НА МОНОНУКЛЕОТИДЫ МОЗГА И НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС РЕАНИМИРОВАННЫХ КРЫС

П.П. Золин*, В.Д. Конвай*/**

*Омский государственный медицинский университет
(г. Омск)

**Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина
(г. Омск)

Актуальной задачей реаниматологии является поиск новых способов коррекции постреанимационного энергодифицита и восстановления функций головного мозга человека. Цель настоящей работы – проверить на крысах способность экзогенной D-(–)-рибозы влиять на метаболизм свободных нуклеотидов в головном мозге и неврологический статус животных в раннем постреанимационном периоде. Эксперименты выполнены на крысах-самцах, которых подвергали 6,5-минутной асфиксии с последующей реанимацией. Через 30 мин после реанимации под эфирным наркозом прижизненно фиксировали головной мозг крыс в жидком азоте. Контрольных животных подвергали тем же манипуляциям, за исключением асфиксии и реанимации. Установлено, что в мозге реанимированных крыс усиливается катаболизм свободных нуклеотидов, о чем свидетельствуют их сниженные уровни: по сравнению с контрольной группой уменьшилась концентрация нуклеозидди- и трифосфатов ($p < 0,05$) и нуклеозидмонофосфатов ($p < 0,005$). Внутривенное введение D-(–)-рибозы (50 мг на 1 кг массы тела) сразу после реанимации оказывало благоприятный эффект на концентрации в мозге нуклеозидди- и трифосфатов. Авторы полагают, что это связано с фосфорилированием рибозы в рибозо-5-фосфат, от которого зависит образование фосфорибозилдифосфата. Последний обеспечивает реутилизацию азотистых оснований и синтез нуклеотидов *de novo*. Кроме того, авторы считают, что положительный эффект рибозы связан с использованием рибозо-5-фосфата в качестве энергетического субстрата (через образование глицеральдегид-3-фосфата). Как результат, введение крысам рибозы сразу после реанимации приводит к снижению суммарной оценки неврологического дефицита на 20 % ($p < 0,05$), а доли максимальных оценок – почти в 2 раза ($p < 0,05$).

Ключевые слова: рибоза, нуклеозидтрифосфаты, нуклеозиддифосфаты, нуклеозидмонофосфаты, реанимация, головной мозг.

Ответственный за переписку: Золин Петр Петрович, адрес: 644050, г. Омск, просп. Мира, д. 9; e-mail: zolin_petr@mail.ru

Для цитирования: Золин П.П., Конвай В.Д. Влияние рибозы на мононуклеотиды мозга и неврологический статус реанимированных крыс // Журн. мед.-биол. исследований. 2018. Т. 6, № 4. С. 387–396. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.4.387

Во время умирания организма и в постреанимационном периоде в головном мозге усиливается катаболизм свободных мононуклеотидов, в результате они расщепляются до нуклеозидов и азотистых оснований [1, 2], что влечет за собой развитие энергетического дефицита и ряда последующих метаболических и неврологических нарушений. В связи с этим актуален поиск новых способов коррекции постреанимационного энергодефицита, с помощью которых можно было бы эффективно влиять на восстановление церебральных функций. Имеются данные о благоприятном эффекте применения D-(–)-рибозы для коррекции нарушений энергетического обмена при различных экстремальных и терминальных состояниях [3–8], однако в общедоступной литературе отсутствуют публикации о применении рибозы в постреанимационном периоде после клинической смерти.

Цель настоящей работы – проверить на крысах способность экзогенной рибозы влиять на метаболизм свободных нуклеотидов в головном мозге и на неврологический статус животных в раннем постреанимационном периоде.

Материалы и методы. Все исследования проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF). Проведение экспериментов было одобрено этическим комитетом Омского государственного медицинского университета (протокол № 87 от 10.03.2017 г.).

Дизайн исследования включал применение плана параллельных групп и простой рандомизации. Эксперименты были выполнены на 62 беспородных белых крысах-самцах. Из них 38 животных, наркотизированных диэтиловым эфиром, подвергли клинической смерти путем 6,5-минутной механической асфиксии с последующей реанимацией путем искусственного дыхания и непрямого массажа сердца. Из 38 подвергнутых асфиксии крыс 13 реанимировать не удалось, а 25 успешно реанимированных животных разделили на группы «Реанимация»

и «Реанимация+рибоза». Остальные 24 крысы подвергались только контрольным манипуляциям: наркозу, фиксации, интубации; их разделили на группы «Контроль» и «Рибоза».

У крыс всех четырех групп через 30 мин после реанимации или контрольных манипуляций под эфирным наркозом погружали голову в жидкий азот до полного замораживания, тем самым производили эвтаназию животных. За 25 мин до эвтаназии всем крысам вводили в бедренную вену 0,9 %-й раствор NaCl, который брали из расчета 2,5 мл на 1 кг массы тела. Раствор, предназначенный для групп «Реанимация+рибоза» и «Рибоза», содержал также D-(–)-рибозу производства компании Fluka AG, Buchs SG (Швейцария) в дозе 50 мг на 1 кг массы тела.

Непосредственно перед второй дачей наркотика и эвтаназией у крыс оценивали неврологический дефицит в баллах по шкале Н.Н.Л. Hendrickx et al. [9], а также для каждого животного определяли долю максимальных оценок неврологического дефицита (в процентах). Кроме того, выраженность рефлексов, включенных в данную шкалу, являлась критерием глубины наркоза, при котором на крысах моделировали клиническую смерть и реанимацию.

Замороженные головы крыс разрубали сагиттально пополам, быстро извлекали мозг, хранили его в жидком азоте. Не допуская оттаивания, быстро гомогенизировали навеску мозга в холодной 6 %-й HClO₄, взятой в соотношении 0,4 мл на 100 мг ткани. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 1000 g и 0 °C. Супернатант сразу же нейтрализовали раствором KOH до pH = 7, выдерживали 15 мин при 0 °C и осадок KClO₄ отделяли центрифугированием при вышеописанных условиях. В хлорнокислом экстракте головного мозга описанным ранее методом [10] определяли суммарное содержание нуклеозидди- и трифосфатов (НДТФ), нуклеозидмонофосфатов (НМФ), нуклеозидов и азотистых оснований (НАО), а также снимали их спектры. Концентрации НДТФ, НМФ и НАО выражали в единицах оптической плотности (ЕОП) на 1 г сырой массы мозга.

Дескриптивная статистическая обработка результатов включала в себя вычисление для каждой выборки (группы животных) средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). Затем производили сравнение двух попарно не связанных выборок по их средним тенденциям при помощи непараметрического рангового критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Уровни значимости различий для этого критерия определяли по справочным таблицам¹.

Результаты. У крыс, реанимированных после клинической смерти, через полчаса после начала оживления имели место сильнейшие неврологические нарушения, показателями которых являлись сумма балльных оценок неврологического дефицита и доля максимальных оценок неврологического дефицита (см. таблицу, группа «Реанимация»). Однократное внутривенное введение крысам рибозы в дозе 50 мг·кг⁻¹ сразу после восстановления сердцебиения в ходе реанимации приводило на

30-й минуте постреанимационного периода к снижению суммарной оценки неврологического дефицита на 20 %, а доли максимальных оценок – почти в 2 раза. Различия по этим показателям между группами «Реанимация» и «Реанимация+рибоза» статистически значимы ($p < 0,05$). Небольшие признаки неврологического дефицита, обнаруженные в группах здоровых крыс («Контроль» и «Рибоза»), связаны, вероятно, с действием наркоза, а также, в меньшей мере, с влиянием иммобилизации и интубации.

Установлено, что в группе «Реанимация» через 30 мин после начала оживления концентрации НДТФ и НМФ статистически значимо снижались до уровней 80 и 68 % от контроля соответственно (см. таблицу).

При введении крысам сразу после оживления раствора рибозы (группа «Реанимация+рибоза») концентрация НДТФ к 30-й минуте постреанимационного периода практически

ВЛИЯНИЕ РЕАНИМАЦИИ И ВВЕДЕНИЯ РИБОЗЫ НА НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС И ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА МОНОНУКЛЕОТИДОВ У КРЫС

Показатель	Группа крыс				p-уровень
	Контроль (1)	Реанимация (2)	Реанимация + рибоза (3)	Рибоза (4)	
Неврологический дефицит, баллы	27±4	324±18	260±27	30±5	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,05$
Доля максимальных оценок неврологического дефицита, %	5,7±2,3	50,1±7,1	26,2±8,6	7,2±3,2	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
НДТФ, ЕОП·г ⁻¹	89,3±7,6	71,5±9,0	86,8±17,5	83,0±18,0	$p_{1-2} < 0,05$
НМФ, ЕОП·г ⁻¹	21,5±1,4	14,7±1,3	12,7±0,5	16,6±1,1	$p_{1-2} < 0,005$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{1-4} < 0,02$
НАО, ЕОП·г ⁻¹	70,4±5,5	81,2±4,9	87,3±12,1	68,8±6,6	$p_{1-2} < 0,05$

Примечание. Оценка показателей производилась на 30-й минуте постреанимационного периода или через 30 мин после контрольных манипуляций.

¹Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. 143 с.

не отличалась от контроля, но содержание НМФ составляло по отношению к нему лишь 59 % (данное снижение было статистически значимо). В результате введения рибозы здоровым животным (группа «Рибоза») концентрация НДФ существенно не изменялась, а содержание НМФ статистически значимо уменьшалось до уровня 77 % от контроля.

Известно, что по содержанию в различных органах и тканях, в т. ч. в мозге, пуриновые мононуклеотиды преобладают над другими свободными нуклеотидами – пиримидиновыми, пиридиновыми [11–14]. Поскольку многие нуклеотиды имеют характерные спектры поглощения в ближней ультрафиолетовой области², нами были исследованы (при pH = 5) спектральные характеристики растворов НДФ головного мозга крыс при длинах волн 250, 260, 270, 280 и 290 нм, как описано ранее [10]. Оказалось, что во всех пробах НДФ встречался только один максимум поглощения, приходящийся на 260 нм, что свидетельствует о преобладании аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ) в мозге крыс всех изученных групп.

Сравнивались также соотношения абсорбций A_{250}/A_{260} и A_{280}/A_{260} . В результате установлено, что средние арифметические отношений A_{250}/A_{260} и A_{280}/A_{260} равнялись соответственно: в группе «Контроль» – 0,96 и 0,44; в группе «Реанимация» – 0,90 и 0,39; в группе «Реанимация+рибоза» – 0,88 и 0,34; в группе «Рибоза» – 0,88 и 0,32. Эти спектральные данные свидетельствуют о том, что в раннем пост-реанимационном периоде гуанозинтрифосфат (ГТФ) и гуанозиндифосфат (ГДФ) в мозге деградируют в большей мере, чем АТФ и АДФ. Введение рибозы как реанимированным, так и здоровым животным сильнее стимулирует образование адениновых производных, чем гуаниновых (отношение (АТФ + АДФ) / (ГТФ + ГДФ) увеличивается); кроме того, в мозге жи-

вотных группы «Рибоза» усиливается образование инозиновых производных.

Во всех группах крыс были изучены (при pH = 7) спектральные характеристики растворов НМФ головного мозга при длинах волн 250, 260, 270, 280 и 290 нм. Сравнивались положения максимумов поглощения (λ_{max}), а также отношения абсорбций A_{250}/A_{260} , A_{280}/A_{260} и A_{290}/A_{260} , заметно отличающиеся у разных НМФ³. Было установлено, что в контрольной группе встречались крысы как с соотношением $A_{250} > A_{260}$, так и с $A_{250} < A_{260}$, а средние арифметические были равны: $A_{250}/A_{260} = 1,03$; $A_{280}/A_{260} = 0,56$ и $A_{290}/A_{260} = 0,29$.

У всех без исключения животных группы «Реанимация» наблюдалось соотношение $A_{250} > A_{260}$, а средние арифметические составили: $A_{250}/A_{260} = 1,09$; $A_{280}/A_{260} = 0,68$; $A_{290}/A_{260} = 0,36$. Более выраженное увеличение в этой группе A_{280}/A_{260} по сравнению с A_{250}/A_{260} свидетельствует о том, что доля аденозинмонофосфата (АМФ) во фракции НМФ снижалась. При этом доля гуанозинмонофосфата (ГМФ) возрастала – вследствие уменьшения общего содержания НМФ в мозге (см. таблицу), а также, вероятно, из-за более сильного катаболизма ГТФ и ГДФ.

В группе «Рибоза» были получены следующие результаты: $A_{250}/A_{260} = 1,04$; $A_{280}/A_{260} = 0,59$; $A_{290}/A_{260} = 0,29$, что свидетельствует о возрастании в мозге данных крыс доли инозинмонофосфата во фракции НМФ при сохранении нормального соотношения АМФ/ГМФ.

В группе «Реанимация+рибоза» у всех животных наблюдалось соотношение $A_{250} > A_{260}$, а средние арифметические равнялись: $A_{250}/A_{260} = 1,20$; $A_{280}/A_{260} = 0,72$; $A_{290}/A_{260} = 0,38$, что говорит о возрастании в мозге доли как ГМФ, так и инозинмонофосфата, т. е. о наложении друг на друга эффектов клинической смерти и рибозы.

²Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.

³Там же.

Содержание в хлорнокислом экстракте мозга НАО, образующихся в результате распада пуриновых мононуклеотидов, у крыс группы «Реанимация» было равно 115 % от контроля при статистической значимости этого сдвига. В группах «Реанимация+рибоза» и «Рибоза» отличия от контроля были статистически незначимы, хотя в первой из названных групп превышение над контролем составило 24 %.

Кроме того, во всех группах был проведен спектральный анализ растворов НАО мозга при pH = 7 в интервале длин волн 230–300 нм, как описано ранее [10]. Сравнивались положения максимумов поглощения (λ_{\max}), а также отношения абсорбций A_{250}/A_{260} , A_{280}/A_{260} и A_{290}/A_{260} . Было установлено, что в контрольной группе A_{250}/A_{260} , A_{280}/A_{260} и A_{290}/A_{260} составляют соответственно 1,27; 0,85 и 0,48. В группе «Реанимация» эти отношения равнялись 1,28; 0,86 и 0,45. Можно полагать, что снижение A_{290}/A_{260} связано с некоторым увеличением в составе НАО долей инозина, гипоксантина, ксантина и гуанина. Повышение доли ксантина подтверждается тем, что в группе «Контроль» пробы с максимумом в области 270 нм составили 41 %, а в группе «Реанимация» – 50 %.

В группе «Реанимация+рибоза» $A_{250}/A_{260} = 1,28$; $A_{280}/A_{260} = 0,82$ и $A_{290}/A_{260} = 0,48$, т. е. отношение A_{290}/A_{260} вернулось к контрольному уровню, а пробы с максимумом в области 270 нм составили 17 % от объема выборки. В группе «Рибоза» отношения экстинкций фракции НАО практически не отличались от контроля: $A_{250}/A_{260} = 1,26$; $A_{280}/A_{260} = 0,86$ и $A_{290}/A_{260} = 0,48$, а максимумы в области 270 нм встречались в 60 % случаев.

Обсуждение. Снижение уровня НДФ в раннем постреанимационном периоде (см. таблицу) согласуется с многочисленными литературными данными об усиленном катаболизме макроэргических мононуклеотидов при гипоксических и ишемических состояниях [2,

7, 14–19]. Выявленное в результате спектрального анализа снижение доли гуаниновых производных во фракции НДФ подтверждается обобщенными сведениями [16] о более выраженном катаболизме ГТФ по сравнению с АТФ при ишемии и гипоксии мозга.

Из-за неоднозначности литературных данных [2, 7, 14–16] обнаруженное нами уменьшение уровня НМФ во всех группах крыс (см. таблицу) представляет больший интерес для анализа, чем катаболизм НДФ. Известно, что в физиологических условиях соотношение между мононуклеотидами с различным числом остатков фосфорной кислоты строго поддерживается НМФ-киназами: аденилаткиназой, гуанилаткиназой, нуклеозидтрифосфатаденилаткиназой [14, 16, 20]. Всего на сегодняшний день известны 6 таких киназ различной субклеточной локализации [15]. НМФ-киназная реакция в общем виде представляет собой превращение 2 молекул нуклеозиддифосфата в 1 молекулу НМФ и 1 молекулу нуклеозидтрифосфата, что позволяет временно восполнить дефицит последнего при его физиологическом снижении по каким-либо причинам. Кроме того, в аденилаткиназной реакции образуется АМФ – мощный аллостерический активатор фосфофруктокиназы, что является важным механизмом увеличения концентрации АТФ в эритроцитах [20], для которых, как известно, единственным источником АТФ служит анаэробный гликолиз.

Для миоцитов описан несколько иной механизм. В сокращающейся мышце аденилаткиназная реакция также является источником быстрого восполнения пула АТФ, однако для сдвига этой реакции вправо используется не только накопление АДФ при мышечном сокращении, но и удаление второго продукта этой реакции – АМФ путем его дезаминирования в инозинмонофосфат⁴. При этом, очевидно, значение АМФ как аллостерического регулятора отходит на второй план.

⁴Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия. М.: Мир, 2004. 469 с.

Когда во время клинической смерти нуклеозидтрифосфаты отдают для нужд метаболизма энергию концевых макроэргических связей и превращаются в нуклеозиддифосфаты, концентрация последних возрастает, поскольку их обратное фосфорилирование в это время заторможено из-за гипоксии. Чтобы получить больше нуклеозидтрифосфатов, нужно сдвинуть равновесие в НМФ-киназных реакциях вправо; этому способствует не только накопление нуклеозиддифосфатов, но и удаление из реакции образующихся НМФ. Удаление АМФ происходит, во-первых, путем его усиленного превращения в инозинмонофосфат, поскольку АМФ-деаминаза активируется при уменьшении уровня ГТФ и закислении тканей, закономерно происходящих вследствие гипоксии [2]. Во-вторых, по мере снижения концентрации АТФ и креатинфосфата, ингибиторов 5'-нуклеотидазы, усиливается расщепление этим ферментом всех НМФ до нуклеозидов и рибозо-1-фосфата [2].

Обмен гуаниновых мононуклеотидов в головном мозге имеет ряд особенностей [16]. Во-первых, активность гуанилаткиназы в мозге выше, чем в других тканях, поэтому накопление ГМФ в результате катаболизма ГТФ и ГДФ происходит быстрее. Во-вторых, в мозге действуют как аденозиндеаминазный, так и 5'-нуклеотидазный пути распада НМФ, но, в отличие от других органов, ГТФ подавляет активность 5'-нуклеотидазы мозга, а значит, она возрастает при распаде ГТФ, вследствие чего 5'-нуклеотидаза подвергается усиленному дефосфорилированию не только ГМФ, но и другие НМФ. В итоге доля ГМФ во фракции НМФ должна возрастать, что нашло подтверждение в наших спектральных исследованиях.

На содержание НМФ могут оказывать влияние следующие факторы: интенсивность катаболизма НДТФ и, в меньшей мере, нуклеиновых кислот, а также скорости катаболизма самих НМФ и их образования из нуклеозидов,

азотистых оснований или путем синтеза *de novo* [2, 8, 12–14, 16].

Экзогенная рибоза в клетках различных органов фосфорилируется до рибозо-5-фосфата, который далее может либо использоваться в качестве энергетического субстрата, либо превращается в фосфорибозилдифосфат – ключевой предшественник как для реутилизации азотистых оснований, так и для синтеза пуринов *de novo* [2, 8, 12, 14]. Известно, что рибоза хорошо проходит сквозь клеточные мембраны и через гематоэнцефалический барьер [14, 21]. Установлено также, что рибоза активно утилизируется клетками крысиного мозга, в которых она под действием рибокиназы сначала превращается в рибозо-5-фосфат и далее, под действием фосфорибозилдифосфатсинтетазы, в фосфорибозилдифосфат [14, 22].

Мы нашли лишь одну работу, рассматривающую влияние рибозы на мозг человека [23]. В ней описано пробное лечение рибозой пациентки с наследственной недостаточностью аденилосукцинатазины – фермента, участвующего в синтезе пуринов *de novo*, а также в превращении инозинмонофосфата в адениновые мононуклеотиды. Применение рибозы смягчало тяжелые неврологические нарушения, характерные для данной патологии, а при отмене рибозы они опять резко усиливались. Судя по повышенному выделению из организма урата с мочой, эффект рибозы был отчасти обусловлен усиленным синтезом пуриновых мононуклеотидов. Второй механизм благоприятного действия рибозы, вероятно, связан с ее использованием в мозге как энергетического субстрата, поскольку замена рибозы на эквивалентное количество глюкозы не приводила к ухудшению неврологического состояния пациентки, в отличие от простой отмены препарата [23].

Расчеты показывают, что для использования экзогенной рибозы в качестве энергетического субстрата необходимо сначала затратить энергию 5 концевых макроэргических связей

АТФ на 3 молекулы рибозы, чтобы получить из них 5 молекул глицеральдегид-3-фосфата, но их последующее окисление дает в анаэробных условиях 10 молекул АТФ, а в аэробных условиях – 100 молекул АТФ [2], т. е. энергетически весьма выгодно. Спектральный анализ фракций НДТФ и НМФ позволил нам уточнить характер влияния рибозы на энергетический обмен в головном мозге. Превращение экзогенной рибозы в фосфорибозилдифосфат приводит к усиленному образованию АМФ из аденина, а также инозинмонофосфата из гипоксантина. Одновременно (вероятно, с еще большей интенсивностью) рибоза используется в качестве энергетического субстрата, что приводит к увеличению отношения АТФ/АДФ и фосфорили-

рованию АМФ до АДФ со скоростью, превышающей скорость синтеза АМФ. За счет убыли АМФ суммарное содержание НМФ в мозге крыс групп «Рибоза» и «Реанимация+рибоза» снижается.

Многие специфические функции мозга крайне энергозависимы, поэтому по итогам проведенного исследования можно сделать выводы, что улучшение неврологического статуса реанимированных животных под действием рибозы обусловлено, во-первых, ее способностью восстанавливать пул НДТФ (молекул – носителей макроэргических связей), а во-вторых – способностью давать при окислении энергию, которая аккумулируется в макроэргических связях НДТФ.

Список литературы

1. Knapp J., Schneider A., Nees C., Bruckner T., Böttiger B.W., Popp E. Effects of Adenosine Monophosphate on Induction of Therapeutic Hypothermia and Neuronal Damage After Cardiopulmonary Resuscitation in Rats // Resuscitation. 2014. Vol. 85, № 9. P. 1291–1297.
2. Золин П.П. Обмен гипоксантина в постреанимационном периоде: моногр. Саратов: Ай Пи Эр Медиа, 2018. 207 с.
3. Addis P., Shecterle L.M., St. Cyr J.A. Cellular Protection During Oxidative Stress: A Potential Role for D-Ribose and Antioxidants // J. Diet. Suppl. 2012. Vol. 9, № 3. P. 178–182.
4. Falana B., Adeleke O., Orenolu M., Osinubi A., Oyewopo A. Effect of D-Ribose-L-Cysteine on Aluminum Induced Testicular Damage in Male Sprague-Dawley Rats // JBRA Assist. Reprod. 2017. Vol. 21, № 2. P. 94–100.
5. Frenguelli B.G. The Purine Salvage Pathway and the Restoration of Cerebral ATP: Implications for Brain Slice Physiology and Brain Injury // Neurochem. Res. 2017. DOI: 10.1007/s11064-017-2386-6
6. Perkowski D.J., Wagner S., Schneider J.R., St. Cyr J.A. A Targeted Metabolic Protocol with D-Ribose for Off-Pump Coronary Artery Bypass Procedures: A Retrospective Analysis // Ther. Adv. Cardiovasc. Dis. 2011. Vol. 5, № 4. P. 185–192.
7. zur Nedden S., Doney A.S., Frenguelli B.G. Modulation of Intracellular ATP Determines Adenosine Release and Functional Outcome in Response to Metabolic Stress in Rat Hippocampal Slices and Cerebellar Granule Cells // J. Neurochem. 2014. Vol. 128, № 1. P. 111–124.
8. Чигринский Е. Антиоксидантная система семенников при физических нагрузках. Экспериментальное исследование. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing, 2012. 152 с.
9. Hendrickx H.H.L., Rao G.R., Safar P., Gisvold S.E. Asphyxia, Cardiac Arrest and Resuscitation in Rats // Resuscitation. 1984. Vol. 12, № 2. P. 97–116.
10. Золин П.П., Конвай В.Д., Домрачев А.А. Фракционирование пуриновых производных в изучении энергетического обмена // Вестн. Омск. ун-та. 2017. № 1. С. 65–70.
11. Abadi R.H. Analysis of Free Nucleotide Pools of Mouse Liver Tissue by High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) // Indian J. Biochem. Biophys. 2003. Vol. 40, № 3. P. 209–212.
12. Henderson J.F., Paterson A.R.P. Nucleotide Metabolism: An Introduction. Burlington: Elsevier Science, 2014. 304 p.
13. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology / ed. by R.L. Lundblad, F. Macdonald. 4th ed. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. 1080 p.

14. zur Nedden S. Targeting the Purine Salvage Pathway in *in vitro* Models of Cerebral Ischemia: PhD Thesis. Coventry, 2011. 268 p.
15. Zolin P.P., Conwai V.D. Disturbances of Hypoxanthine Metabolism in the Liver of Resuscitated Rats // Bull. Exp. Biol. Med. 1997. Vol. 124, № 6. P. 1180–1182.
16. Хватова Е.М., Сидоркина А.Н., Миронова Г.В. Нуклеотиды мозга: метаболизм и оценка при кислородном голодании. М.: Медицина, 1987. 208 с.
17. Galinsky R., Davidson J.O., Dean J.M., Green C.R., Bennet L., Gunn A.J. Glia and Hemichannels: Key Mediators of Perinatal Encephalopathy // Neural Regen. Res. 2018. Vol. 13, № 2. P. 181–189. DOI: 10.4103/1673-5374.226378
18. Kratimenos P., Koutroulis I., Jain A., Malaeb S., Delivoria-Papadopoulou M. Effect of Concurrent Src Kinase Inhibition with Short-Duration Hypothermia on Ca²⁺/Calmodulin Kinase IV Activity and Neuropathology After Hypoxia-Ischemia in the Newborn Swine Brain // Neonatology. 2018. Vol. 113, № 1. P. 37–43. DOI: 10.1159/000480067
19. Liu R.Z., Fan C.X., Zhang Z.L., Zhao X., Sun Y., Liu H.H., Nie Z.X., Pu X.P. Effects of DI-3-n-Butylphthalide on Cerebral Ischemia Infarction in Rat Model by Mass Spectrometry Imaging // Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol. 18, № 11. Art. № 2451. DOI: 10.3390/ijms18112451
20. Дудиньска В., Хлынчак А.Й., Скотницка Е., Суска М. Метаболизм пуринов в эритроцитах человека // Биохимия. 2006. Т. 71, вып. 5. С. 581–591.
21. Sacerdote M.G., Szostak J.W. Semipermeable Lipid Bilayers Exhibit Diastereoselectivity Favoring Ribose // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102, № 17. P. 6004–6008.
22. Barsotti C., Ipata P.L. Pathways for Alpha-D-Ribose Utilization for Nucleobase Salvage and 5-Fluorouracil Activation in Rat Brain // Biochem. Pharmacol. 2002. Vol. 63, № 2. P. 117–122.
23. Salerno C., D'Eufemia P., Finocchiaro R., Celli M., Spalice A., Iannetti P., Crifo C., Giardini O. Effect of D-Ribose on Purine Synthesis and Neurological Symptoms in a Patient with Adenylosuccinase Deficiency // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1453, № 1. P. 135–140.

References

1. Knapp J., Schneider A., Nees C., Bruckner T., Böttiger B.W., Popp E. Effects of Adenosine Monophosphate on Induction of Therapeutic Hypothermia and Neuronal Damage After Cardiopulmonary Resuscitation in Rats. *Resuscitation*, 2014, vol. 85, no. 9, pp. 1291–1297.
2. Zolin P.P. *Obmen gipoksantina v postreanimatsionnom periode* [Hypoxanthine Metabolism in the Post-Resuscitation Period]. Saratov, 2018. 207 p.
3. Addis P., Shechter L.M., St. Cyr J.A. Cellular Protection During Oxidative Stress: A Potential Role for D-Ribose and Antioxidants. *J. Diet. Suppl.*, 2012, vol. 9, no. 3, pp. 178–182.
4. Falana B., Adeleke O., Orenolu M., Osinubi A., Oyewopo A. Effect of D-Ribose-L-Cysteine on Aluminum Induced Testicular Damage in Male Sprague-Dawley Rats. *JBRA Assist. Reprod.*, 2017, vol. 21, no. 2, pp. 94–100.
5. Frenguelli B.G. The Purine Salvage Pathway and the Restoration of Cerebral ATP: Implications for Brain Slice Physiology and Brain Injury. *Neurochem. Res.*, 2017. DOI: 10.1007/s11064-017-2386-6
6. Perkowski D.J., Wagner S., Schneider J.R., St. Cyr J.A. A Targeted Metabolic Protocol with D-Ribose for Off-Pump Coronary Artery Bypass Procedures: A Retrospective Analysis. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.*, 2011, vol. 5, no. 4, pp. 185–192.
7. zur Nedden S., Doney A.S., Frenguelli B.G. Modulation of Intracellular ATP Determines Adenosine Release and Functional Outcome in Response to Metabolic Stress in Rat Hippocampal Slices and Cerebellar Granule Cells. *J. Neurochem.*, 2014, vol. 128, no. 1, pp. 111–124.
8. Chigrinskiy E. *Antioksidantnaya sistema semennikov pri fizicheskikh nagruzkakh. Eksperimental'noe issledovanie* [Antioxidant System in Testes at Physical Exercise. An Experimental Study]. Saarbrücken, 2012. 152 p.
9. Hendrickx H.H.L., Rao G.R., Safar P., Gisvold S.E. Asphyxia, Cardiac Arrest and Resuscitation in Rats. *Resuscitation*, 1984, vol. 12, no. 2, pp. 97–116.

10. Zolin P.P., Konvay V.D., Domrachev A.A. Fraktsionirovanie purinovykh proizvodnykh v izuchenii energeticheskogo obmena [Fractionation of Purine Derivatives for Studying Energy Metabolism]. *Vestnik Omskogo universiteta*, 2017, no. 1, pp. 65–70.
11. Abadi R.H. Analysis of Free Nucleotide Pools of Mouse Liver Tissue by High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC). *Indian J. Biochem. Biophys.*, 2003, vol. 40, no. 3, pp. 209–212.
12. Henderson J.F., Paterson A.R.P. *Nucleotide Metabolism: An Introduction*. Burlington, 2014. 304 p.
13. Lundblad R.L., Macdonald F. (eds.). *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. London, 2010. 1080 p.
14. zur Nedden S. *Targeting the Purine Salvage Pathway in in vitro Models of Cerebral Ischemia: PhD Thesis*. Coventry, 2011. 268 p.
15. Zolin P.P., Konvay V.D. Disturbances of Hypoxanthine Metabolism in the Liver of Resuscitated Rats. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1997, vol. 124, no. 6, pp. 1180–1182.
16. Khvatova E.M., Sidorkina A.N., Mironova G.V. *Nukleotidy mozga: metabolizm i otsenka pri kislorodnom golodanii* [Brain Nucleotides: Metabolism and Hypoxia]. Moscow, 1987. 208 p.
17. Galinsky R., Davidson J.O., Dean J.M., Green C.R., Bennet L., Gunn A.J. Glia and Hemichannels: Key Mediators of Perinatal Encephalopathy. *Neural Regen. Res.*, 2018, vol. 13, no. 2, pp. 181–189. DOI: 10.4103/1673-5374.226378
18. Kratimenos P., Koutroulis I., Jain A., Malaeb S., Delivoria-Papadopoulos M. Effect of Concurrent Src Kinase Inhibition with Short-Duration Hypothermia on Ca²⁺/Calmodulin Kinase IV Activity and Neuropathology After Hypoxia-Ischemia in the Newborn Swine Brain. *Neonatology*, 2018, vol. 113, no. 1, pp. 37–43. DOI: 10.1159/000480067
19. Liu R.Z., Fan C.X., Zhang Z.L., Zhao X., Sun Y., Liu H.H., Nie Z.X., Pu X.P. Effects of DI-3-n-Butylphthalide on Cerebral Ischemia Infarction in Rat Model by Mass Spectrometry Imaging. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 11. Art. no. 2451. DOI: 10.3390/ijms18112451
20. Dudin'ska V., Khlynchak A.Y., Skotnitska E., Suska M. Metabolizm purinov v eritrotsitakh cheloveka [Purine Metabolism of Human Erythrocytes]. *Biokhimiya*, 2006, vol. 71, no. 5, pp. 581–591.
21. Sacerdote M.G., Szostak J.W. Semipermeable Lipid Bilayers Exhibit Diastereoselectivity Favoring Ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 17, pp. 6004–6008.
22. Barsotti C., Ipata P.L. Pathways for Alpha-D-Ribose Utilization for Nucleobase Salvage and 5-Fluorouracil Activation in Rat Brain. *Biochem. Pharmacol.*, 2002, vol. 63, no. 2, pp. 117–122.
23. Salerno C., D'Eufemia P., Finocchiaro R., Celli M., Spalice A., Iannetti P., Crifò C., Giardini O. Effect of D-Ribose on Purine Synthesis and Neurological Symptoms in a Patient with Adenylosuccinase Deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 1453, no. 1, pp. 135–140.

DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.4.387

Petr P. Zolin*, Vladimir D. Konvay*/**

*Omsk State Medical University
(Omsk, Russian Federation)

**Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin
(Omsk, Russian Federation)

INFLUENCE OF RIBOSE ON BRAIN MONONUCLEOTIDES AND NEUROLOGICAL STATUS OF RESUSCITATED RATS

Resuscitation science is currently searching for new ways to treat post-resuscitation energy deficits and restore human brain functions. This paper aimed to test the ability of exogenous D-(–)-ribose to influence the metabolism of free nucleotides in rat brain and the neurological status of rats in the early

post-resuscitation period. Experiments were carried out on male rats exposed to 6.5 min asphyxia followed by resuscitation. Rats were narcotized with ether 30 min after resuscitation, and their brains were placed in liquid nitrogen *ex vivo*. The control animals were subjected to the same procedures except for asphyxia and resuscitation. We found enhanced catabolism of free nucleotides in the brain of resuscitated rats, as evidenced by their reduced content; namely, the concentration of nucleoside di- and triphosphates ($p < 0.05$) and nucleoside monophosphates decreased ($p < 0.005$) as compared with the control group. Intravenous injection of D-(–)-ribose (50 mg/kg body weight) immediately after resuscitation had a beneficial effect on nucleoside di- and triphosphates concentration in the brain. The authors suppose that it is associated with phosphorylation of ribose to ribose-5-phosphate, which is essential for phosphoribosyl diphosphate formation. The latter provides the inclusion of nucleobases in salvage pathway and nucleotide synthesis *de novo*. In addition, the authors believe that the positive effect of ribose is due to the use of ribose-5-phosphate as an energy substrate through the formation of glyceraldehyde-3-phosphate. As a result, injection of ribose in rats immediately after resuscitation leads to a 20 % decrease in the sum scores of neurological deficit ($p < 0.05$) and a twofold decrease in the share of maximal scores ($p < 0.05$).

Keywords: *ribose, nucleoside triphosphates, nucleoside diphosphates, nucleoside monophosphates, resuscitation, brain.*

Поступила 19.02.2018
Received 19 February 2018

Corresponding author: Petr Zolin, address: prosp. Mira 9, Omsk, 644050, Russian Federation; e-mail: zolin_petr@mail.ru

For citation: Zolin P.P., Konvay V.D. Influence of Ribose on Brain Mononucleotides and Neurological Status of Resuscitated Rats. *Journal of Medical and Biological Research*, 2018, vol. 6, no. 4, pp. 387–396. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2018.6.4.387