

УДК 616+615.1+378+e399252

## **Ганна ЗАЙЧЕНКО**

доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, просп. Перемоги, 34, м. Київ, Україна, 02000 (anna.zajchenko@gmail.com)

**ORCID:** 0000-0002-3506-4800

**Scopus Author ID:** 57205340158

## **Олена СТРИГА**

доктор філософії, старший викладач кафедри фармакології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, просп. Перемоги, 34, м. Київ, Україна, 02000 (stri.lena26@gmail.com)

**ORCID ID:** 0000-0002-9868-0264

## **Ігор БЕЛЕНІЧЕВ**

доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакології та нормальної фізіології, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035 (I.belenichev1914@gmail.com)

**ORCID:** 0000-0003-1273-5314

**Scopus Author ID:** 6602434760

## **Надія ГОРЧАКОВА**

доктор медичних наук, професор, професор кафедри фармакології, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, просп. Перемоги, 34, м. Київ, Україна, 02000 (gorchakovan1941@gmail.com)

**ORCID ID:** 0000-0001-7311-7347

**Scopus Author ID:** 7003895729

## **Олег КУЧКОВСЬКИЙ**

кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри фармакології та нормальної фізіології, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035 (olegk181@gmail.com)

**ORCID ID:** 0000-0002-0548-0029

**Scopus Author ID:** 6508296867

**DOI:** 10.33617/2522-9680-2022-2-4

**Бібліографічний опис статті:** Зайченко Г., Стрига О., Беленічев І., Горчакова Н., Кучковський О. (2022). Вплив ресвератролу на NO/SH-механізми пошкодження нейронів при експериментальній ВКД-гіпоестрогенемії. *Фітотерапія. Часопис*, 2, 4–12, doi: 10.33617/2522-9680-2022-2-4

## **ВПЛИВ РЕСВЕРАТРОЛУ НА NO/SH-МЕХАНІЗМИ ПОШКОДЖЕННЯ НЕЙРОНІВ ПРИБЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ВКД-ГІПОЕСТРОГЕНЕМІЇ**

Встановлено, що під час клімаксу відбуваються зміни не тільки у сечостатевої системі, але і в діяльності серцево-судинної і нервової систем. Фітоестрогени не тільки усувають симптоми менопаузи, але і, на відміну від гормональної терапії, мають менше побічних ефектів. Ресвератрол є одним із фітоестрогенних препаратів, який, як було встановлено, впливає на патобіохімічні цілі нервової та серцево-судинної систем.

**Метою дослідження** є встановлення нейропротекторної та антиоксидантної дії вагінального гелю з ресвератролом у монотерапії, а також комбінованого ефекту гелю з ресвератролом і пероральним введенням ресвератролу.

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження проводили на 30 безпородних білих нелінійних самках щурів вагою 220–240 г і віком 4,5 місяця. Для імітації гіпоестрогенемії у щурів з неушкодженими яєчниками використовували хімічну речовину ВКД. Після моделювання патології одній групі тварин ввели гель з ресвератролом, іншій – гель з ресвератролом у поєднанні з таблетками ресвератролу, а третій – інтравагінальний крем «Колпотрофін». Для дослідження була взята кров з черевної аорти і тканини головного мозку, в яких характер експресії мРНК, iNOS, eNOS, nNOS визначався методом полімеразної ланцюгової реакції. У головному мозку також було виявлено вміст нітрозуючого маркера стресу, нітротирозину, а також стан тіол-дисульфідної системи відповідно до методичних рекомендацій.

**Результати досліджень.** Встановлено, що під час курсу введення вагінального крему «Колпотрофін», вагінального гелю з ресвератролом та його поєднання з таблетками ресвератролу самкам-щуркам з гіпоестрогенемією всі досліджувані препарати проявляють нейропротекторну та антиоксидантну дію. Найбільший ефект був відзначений для ресвератролу в лікарських формах.

**Висновки.** У разі введення гелю з ресвератролом і його в поєднанні з таблетками ресвератролу встановлено, що здатність препарату нормалізувати нітрозидергічну систему і підвищувати активність глутатіонної ланки тіол-дисульфідної системи полягає в реалізації механізмів антиоксидантної і нейропротекторної дії ресвератролу у разі гіпоестрогенемії.

**Ключові слова:** ресвератрол, гіпоестрогенемія, антиоксидант, нейропротекторна дія, нітрозидергічна, тіол-дисульфідна система.

## **Ganna ZAYCHENKO**

Ph.D., Professor, Head of the Department of Pharmacology, Bogomolets National Medical University, Victory Avenue, 34, Kyiv, Ukraine, 02000 (anna.zajchenko@gmail.com)

**ORCID:** 0000-0002-3506-4800

**Scopus Author ID:** 57205340158

## **Olena STRYGA**

Ph.D., Senior Lecturer of the Department of Pharmacology, Bogomolets National Medical University, Victory Avenue, 34, Kyiv, Ukraine, 02000 (stri.lena26@gmail.com)

**ORCID:** 0000-0002-9868-0264

## **Igor BELENICHEV**

Ph.D., Professor, Head of the Department of Pharmacology and Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Mayakovsky prosp. 26, Zaporizhzhia, Ukraine, 69035 (I.belenichev1914@gmail.com)

**ORCID:** 0000-0003-1273-5314

**Scopus Author ID:** 6602434760

## **Nadiya GORCHAKOVA**

Ph.D., Professor, Professor of the Department of Pharmacology, Bogomolets National Medical University, Victory Avenue, 34, Kyiv, Ukraine, 02000 (gorchakovan1941@gmail.com)

**ORCID:** 0000-0001-7311-7347

**Scopus Author ID:** 7003895729

## **Oleh KUCHKOVSKIY**

Ph.D., Senior Lecturer of the Department of Pharmacology and Normal Physiology, Zaporizhzhia State Medical University, Mayakovsky prosp. 26, 69035, Zaporizhzhia, Ukraine (olegk181@gmail.com)

**ORCID:** 0000-0002-0548-0029

**Scopus Author ID:** 6508296867

**To cite this article:** Zaychenko G., Stryga O., Belenichev I., Gorchakova N., Kuchkovskiy O. (2022). Vplyv resveratrolu na NO/SH-mekhanizmy poshkodzhennia neuroniv pry eksperymentalnii VKD-hipoestrogenemii [Effect of Resveratrol On NO/SH-Mechanisms of Neuron Damage in Experimental VCD-Hypoestrogenemia]. *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*, 2, 4–12, doi: 10.33617/2522-9680-2022-2-4

## **INFLUENCE OF RESVERATROL ON NO/SH-MECHANISMS OF NEURON DAMAGE IN EXPERIMENTAL VCD-HYPOESTROGENEMIA**

**Introduction.** It was established that in menopause there were changes not only in the urogenital system but also in the activity of the cardiovascular and nervous systems. Phytoestrogens not only eliminate the symptoms of menopause but also, unlike hormone therapy, have fewer side effects. Resveratrol is one of the phytoestrogen drugs, which has been found to affect the pathobiochemical targets of the nervous and cardiovascular systems.

The study aims to establish the neuroprotective and antioxidant action of vaginal gel with resveratrol in monotherapy and the combined effect of gel with resveratrol and oral administration of resveratrol.

**Materials and research methods.** The studies were carried out on 30 outbred white non-linear female rats weighing 220–240 g and aged 4.5 months. The chemical substance VCD was used to simulate hypoestrogenemia in rats with intact ovaries. After modeling the pathology, one group of animals was injected with a gel with resveratrol, the other with a gel in combination with resveratrol tablets, and the third with intravaginal cream “Colpotrofin”. For the study, blood was taken from the abdominal aorta and brain tissue, in which the nature of the expression of mRNA, iNOS, eNOS, and nNOS was determined by the polymerase chain reaction method. In the brain, the content of the nitrosating stress marker, nitrotyrosine, and the state of the thiol-disulfide system was also identified following the methodological recommendations.

**Research results.** It has been established that during the course administration of vaginal cream “Colpotrofin”, vaginal gel with resveratrol and its combination with resveratrol tablets to female rats with hypoestrogenemia, all the studied drugs show neuroprotective and antioxidant effects. The greatest effect was noted for resveratrol in dosage forms.

**Findings.** With the introduction of the gel with resveratrol and its combination with resveratrol tablets, it was found that the ability of the drug to normalize the nitrosidergic system and increase the activity of the glutathione link of the thiol-disulfide system lies in the implementation of the mechanisms of the antioxidant and neuroprotective effects of resveratrol in hypoestrogenemia.

**Key words:** resveratrol, hypoestrogenemia, antioxidant, neuroprotective action, nitrosidergic, thiol-disulfide system.

**Вступ.** У клімактеричному періоді, незважаючи на його фізіологічність, відбуваються стійкі молекулярно-біохімічні зрушення, які призводять не тільки до згасання репродуктивної функції жінки, але і до погіршення якості її життя (Povauskaya, 2018). Під час менопаузи на тлі гіпоестрогенемії, вегетативної дисфункції, підвищеної тривожності, когнітивних порушень зростає ризик серцево-судинних патологій і їхніх несприятливих наслідків (Shestakova et al., 2015). Саме в цей період, як показано експериментальними та клінічними дослідженнями, спостерігається формування дисфункції ендотелію, порушення у системі NO, зміни ліпідного та вуглеводного обміну, підвищення агрегації тромбоцитів.

Наявні експериментальні дані про те, що гіпоестрогенемія на тлі моделювання пери- і постменопаузи супроводжується збільшенням співвідношення мітохондріального Вах/Bclx1, виділенням цитохрому С у цитоплазму, посиленням експресії каспази-3, активацією кінази, ініціюванням апоптозу (Plaksina & Simonovskaya, 2014). У зв'язку з цим немає сумнівів у значущості адекватного комплексного лікування клімактеричних проблем, які виникають у пери- і постменопаузі у жінок. Патогенетичним методом корекції клімактеричних порушень є гормональна замісна терапія, яка призначається для зняття симптомів менопаузи, сечостатевої дисфункції, запобіганню втраті кісткової маси, виникненню колоректального раку, розвитку метаболічних та інших розладів (Radzinskiy & Khamoshina, 2016). Проте в умовах гормональної замісної терапії у жінок з гіпоестрогенемією підвищується ризик розвитку тромбоемболії, ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда, інсульту. Крім того, встановлено, що замісна гормональна терапія не має належного впливу на когнітивні порушення у перименопаузальних і клімактеричних жінок і пов'язана з ризиком розвитку серйозних побічних ефектів (Smetnik, 2014).

Останнім часом були розроблені фітоестрогени, застосування яких призводить до зниження побічних ефектів (Anishchenko, 2014). Однак призначення вагінальних форм препаратів фітоестрогену не призводить до усунення когнітивних розладів, що вимагає введення в терапію додаткових нейропротекторних препаратів у комплексне лікування клімаксу (Rietjens et al., 2016). З огляду на виявлені мо-

лекулярно-біохімічні порушення в ранній менопаузі увагу фармакологів і клініцистів привертають препарати, які знижують інтенсивність оксидативного стресу, запобігають утворенню мітохондріальної дисфункції, ініціюють нейроапоптоз, а також нормалізують тиол-дисульфідний баланс (Zaichenko et al., 2017). До таких препаратів відносять ресвератрол, який має антиоксидантні та естрогеноподібні властивості (Glisic et al., 2018).

**Мета дослідження** – встановити нейропротекторну та антиоксидантну дію вагінального гелю з ресвератролом (у монотерапії), а також у поєднанні вагінального гелю з ресвератролом і пероральним введенням ресвератролу (у разі комбінованого введення фітоестрогену) в частині впливу на показники кон'югованих систем – NO/SH для подальшого обґрунтування оптимальної схеми лікування гіпоестрогенних станів, які виникають у результаті менопаузи.

**Матеріали та методи дослідження.** Досліджені вагінальні гелі ресвератролу були розроблені під керівництвом д. фарм. н., проф. О.А. Рубана на кафедрі заводської технології Національного фармацевтичного університету (м. Харків).

Субстанцію ресвератролу, яка містить 50% транс-ресвератролу рослинного походження, отримано з *Polygonum Cuspidatum* від виробника фармацевтичних субстанцій “Naturex SpA” (Франція), постачальник ТОВ «Компанія Євроімпекс» (серія № С091/004/А16). До складу вагінального гелю, крім ресвератролу, який містить багато фітоестрогенів, входять гіалуронова та молочна кислоти, які є важливими складовими компонентами вагінального середовища і мають антиоксидантну дію (Zauchenko et al., 2018), а також надають ранозагоювальний, капіляррозміцнювальний та протимікробний ефекти (Zauchenko et al., 2021). Як препарат для порівняння за аналогічними показаннями до застосування був відібраний вагінальний крем «Колпотрофін» (Нідерланди, серія: 6Н772), який містить 10 мг проместину.

Дослідження проводилися на 30 безпородних білих нелінійних самках щурів вагою 220–240 г і віком 4,5 місяця. Щурів утримували у стандартних умовах віварію: температура – 20–25°C, відносна вологість – 50–55%, природне освітлення, раціон, рекомендації для цих видів тварин, питний режим “ad libitum”. Експериментальні дослідження

проводили відповідно до основних положень Конвенції Ради Європи про захист ссавців, які використовуються в експериментах та для інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та ін. Для імітації гіпоестрогенемії у щурів з неушкодженими яєчниками використовували хімічну речовину VCD – vinylcyclohexene dioxide; 4-вінілциклогексен діпоксид (Abolaji et al., 2020). Модель VCD рекомендована для вивчення порушень опорно-рухового апарату, серцево-судинної системи і центральної нервової системи у разі перименопаузи і менопаузи (Özel et al., 2020).

У цій роботі ми використовували VCD (Sigma-Aldrich), який розбавляли рафінованою кукурудзяною олією і вводили підшкірно щодня протягом 15 днів у дозі 60 мг/кг. Ця доза викликає руйнування 80–90% дрібних первинних преантральних фолікулів у яєчниках самок щурів, прискорюючи процеси атрезії і тим самим викликаючи передчасний розвиток перименопаузи/менопаузи. Через 15 днів після застосування хімічної речовини VCD для імітації гіпоестрогенемії інтравагінально протягом 28 днів (для комбінованої терапії) вводили вагінальний гель ресвератролу (Р) і таблетки ресвератролу (Herb, USA), інтравагінально протягом 28 днів (для комбінованої терапії), а також референтний препарат крем «Колпотрофін». Крем «Колпотрофін» і гель з ресвератролом вводили інтравагінально один раз на добу за допомогою дозуючого шприца з атравматичним наконечником 0,005 мл/кг, таблетки ресвератролу вводили внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда у вигляді суспензії в дозі 100 мг/кг.

Щурів виводили з експерименту під тіопенталезною анестезією (40 мг/кг). Для дослідження брали кров з черевної артерії і головного мозку. Кров швидко виводили з головного мозку, відокремлювали від мозкових оболонок, а отримані матеріали поміщали в рідкий азот. Потім їх подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному обсязі середовища за 2°C, що містило (у ммоль): сахарози – 250, трис-НСІ-буфера – 20, ЕДТА – 1 (рН 7,4). За температури +4°C методом диференціального центрифугування на центрифугі рефрижераторної Sigma 3-30k (Німеччина) виділяли мітохондріальну фракцію.

### ПЛР у режимі реального часу

Характер експресії pNOS mRNA, eNOS mRNA та iNOS mRNA визначали методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Тканини депарафінували шляхом інкубації в двох послідовних ваннах ксиленів і 100% етанолу. Після розливу і центрифугування осад сушать на повітрі, щоб видалити залишковий етанол.

Виділення загальної РНК від щурячої тканини було проведене за допомогою набору Trizol RNA Prep 100 (ISOGEN, Росія), який містить такі реагенти: Trizol reagent ExtraGene E. РНК виокремлювали відповідно до протокольних наборів. Для оборотної транскрипції (синтез до ДНК) використовували «Набір реагентів для проведення оборотної транскрипції (ВІД-1)» («Сінтола», Росія).

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів був використаний підсилювач CFX96 Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набір реагентів для проведення ПЛР-RT у присутності SYBR Green R-402 («Сінтола», Росія). Специфічні парі праймери (5'–3') для аналізу досліджуваних і еталонних генів були відібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) і виготовлені ThermoScientific, США. Реєстрація інтенсивності флуоресценції відбувалася автоматично наприкінці стадії подовження кожного циклу каналом SybrGreen. Як референс-ген для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген actin, beta (Actb) (Chekman et al., 2018)

### Імуноферментний аналіз

Ступінь споживання нітрозуючого стресу в головному мозку визначали за вмістом маркера нітрозуючого стресу (Abolaji et al., 2020) методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) на повноплашковому імуноферментному аналізаторі (SIRIO S, Італія) з використанням тест-систем «Нітротирозин ІФА-кіт» («Біотехнологія HyCult»).

### Біохімічні методи

Стан тіол-дисульфідної системи головного мозку оцінювався вмістом відновленого глутатіону (RG) і окисленого глутатіону (OG) (Belenichev et al., 2020; Belenichev et al., 2012) флуориметрично з ортофталічним ангідридом на флуориметрі Quantech (Chekman et al., 2018). Рівні вільних SH-груп, активність глутатіону редуктази, глутатіону пероксидази, глутатіонної трансферази, концентрації знижених і окислених груп тіолу вимірювалися спектрофотометрично (Shestakova et al., 2015) за допомогою спектрофотометра Libra S 32 PC.

### Статистика

Дані представлені у вигляді середньої арифметичної і стандартної похибки середнього значення ( $M \pm m$ ). Результати дослідження були оброблені за допомогою статистичного пакета ліцензійної програми STATISTICA® для Windows 6.0 (StatSoft Inc., No. AXXR712D833214FAN5), а також Microsoft Excel 2010. Статистичну обробку проводили за



допомогою Т-тесту Студента та U-тесту Манна-Уїтні. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважалися відмінності з рівнем значущості менше 0,05 (95%) (Gurianov et al., 2018).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Аналізуючи дані, представлені в таблиці 1, що характеризують експресію mRNA eNOS, mRNA nNOS, і mRNA iNOS у CA1-зоні гіпокампу головного мозку самок з гіпоестрогенемією VCD, встановлено таке. Експресія мРНК eNOS у групі необроблених щурів (контрольних) була на 90,8% нижче, ніж у групи неушкоджених тварин. Також було зареєстровано зниження експресії мРНК nNOS на 45,1% і значне зниження мРНК iNOS у 5,2 раза. Імуноферментний аналіз виявив підвищення концентрації нітротирозину в мітохондрії (в 3,94 раза) і в цитозолі головного мозку (в 3,48 раза) у разі VCD-гіпоестрогенемії порівняно зі здоровими самками того ж віку. Виявлені факти свідчать про значні порушення нітрооксидної системи головного мозку і активацію нітрозуючого і окислювального стресу.

Значна роль у механізмах загибелі нейронів у разі різних нейродегенеративних захворювань належить неопосередкованим механізмам, які реалізуються за рахунок підвищення експресії і активності різних ізоформ NOS. (Belenichev et al., 2022). В умовах аутокоїдозу передавача в нейронах (мозочок, гіпокамп, кора) спостерігається активація нейрональної NO синтази (nNOS) і збільшення синтезу NO, яка бере участь в ініціації нейроапоптозу, відкритті пори мітохондрії і утворенні мітохондріальної дисфункції, в нітросилізації SH-місних сигнальних молекул і їх втратних функцій, а також придушення активності Zn-Cu-SOD (Belenichev et al., 2020). Найбільш зловісна роль у пошкодженні нейронів належить індукційній формі NOS, експресія якої гліальними клітинами призводить до гіперпродуктивності не стільки NO, скільки його чис-

ленних цитотоксичних форм – від пероксинітриду до іона нітрозонію.

Низький рівень знижених проміжних продуктів тіол-дисульфідної системи і збільшення концентрації прозапальних цитокинів, особливо IL-1b, відіграють важливу роль у регуляції експресії iNOS і активації нітрозуючого стресу. Так, IL-1b активує AP-1 і NF-kB, які змінюють клітинний сигнал у разі ішемії і збільшують експресію інших прозапальних факторів, стимулюючи при цьому експресію iNOS астроцитами (Belenichev et al., 2020).

Надлишок IL-1b може негативно позначитися на транспортуванні зниженого глутатіону, знижуючи його синтез. Дефіцит внутрішньоклітинного глутатіону, який бере участь у механізмах NO транспорту і його біодоступності, підсилює утворення ONOO- (Belenichev et al., 2012). Відома роль IL-1b у модуляції експресії HSP<sub>70</sub>, починаючи від збільшення до гальмування залежно від концентрації (Belenichev et al., 2020).

Курс лікування вагінальним кремом «Колпотрофін» не справив значного впливу на експресію eNOS mRNA, nNOS mRNA, iNOS і мРНК, а також на концентрацію нітротирозину і маркерів окислювальної модифікації білка в головному мозку самок з VCD-гіпоестрогенемією. Курс введення вагінального гелю з ресвератролом самкам щурів з VCD-гіпоестрогенемією призвів до значного збільшення (на 133%) експресії eNOS mRNA і nNOS mRNA (на 29,3%). При цьому введення ресвератролу не чинило істотного впливу на експресію iNOS mRNA. Також введення гелю ресвератролу призвело до значного зниження нітрозину на 10,3% в мітохондрій і на 19,6% в цитозолі головного мозку самок з гіпоестрогенемією.

Курс комбінованого застосування гелю і таблеток ресвератролу (таблиця 2) призвів до значного збільшення експресії мРНК eNOS у 23 рази і nNOS mRNA в 2,1 раза, а також до зниження експресії мРНК iNOS

Таблиця 1

**Експресія моделі eNOS mRNA, nNOS mRNA, iNOS і mRNA в головному мозку самок щурів з VCD -гіпоестрогенемією і на тлі фармакологічної корекції на 29 добу після лікування (M ± m)**

Експериментальні групи	мРНК eNOS, ум.од.	мРНК nNOS, ум.од.	мРНК iNOS, ум.од.
Інтактний контроль (ІК)	1000±0,008	1,000±0,0032	1,000±0,0112
Контрольна патологія (КП)	0,0918±0,0001	0,549±0,0178	5,194±0,0922
КП + гель з ресвератролом	0,214±0,008*	0,710±0,0057*	5,8765±0,0875*
КП + гель з ресвератролом + таблетки з (Р)	2,1506±0,0033*1,2	1,155±0,011*1,2	2,3008±0,0764*1,2
КП + крем «Колпотрофін»	0,093±0,001	0,6011±0,012	7,0543±0,0765*

Примітка: \* – p < 0,05 стосовно контрольної групи (КП)

<sup>1</sup> – p < 0,05 стосовно групи КП + крем «Колпотрофін»

<sup>2</sup> – p < 0,05 стосовно групи КП + гель з ресвератролом

в 55,7% у СА1-гіпокампі самок з гіпоестрогенемією. Комбіноване введення гелю і таблеток ресвератролу самкам з VCD-гіпоестрогенемією значно знижувало рівень нітротирозину на 37,8% у мітохондрії і на 50,2% у цитозолі головного мозку самок з гіпоестрогенемією. За ступенем впливу на досліджувані параметри комбіноване введення гелю ресвератролу і таблеток значно перевищувало монотерапію гелем ресвератролу і колпотрофіновим гелем. Модуляція експресії різних ізоформ NOS, спрямована на їх нормалізацію і пригнічення нітрозуючого стресу під впливом ресвератролу на різних шляхах його введення в різних лікарських формах, може бути пояснена таким фактом. Ресвератрол, завдяки своїй хімічній структурі, може регулювати активність двох факторів транскрипції ядерного фактора-κВ (p65 / RelA і p50) (Zaichenko et al., 2017).

Ресвератрол також може працювати як прямий антиоксидант – завдяки фенольній групі він зв'язує реактивні види кисню, і тим самим пригнічує ROS-залежні механізми активації IL-1b і iNOS.

Підвищена експресія Mn-SOD значно зменшує потоки нейротоксичного супероксиду, що виробляється мітохондрією (Belenichev et al., 2012), і тим самим пригнічує ROS-залежні механізми активації IL-1b і iNOS. Також антиоксидантну дію ресвератролу можна пояснити тим, що збільшення концентрації естрадіолу під його дією призводить до E2-залежної активації експресії мітохондріального Mn-SOD (Chekman et al., 2018).

Моделювання гіпоестрогенемії VCD призвело до значних порушень у тіол-дисульфідній системі головного мозку самок щурів (таблиця 3), особливо її глутатіонної ланки – зниження пулу його знижених форм і зниження активності цитозольної фракції GPR і GR порівняно з неушкоджен-

Таблиця 2

## Концентрація нітротирозину в головному мозку самок щурів з VCD-гіпоестрогенемією і на тлі фармакологічної корекції на 29 добу після лікування (M ± m)

Експериментальні групи	Нітротирозин, цитозоль пг/мл	Нітротирозин, мітохондрії пг/мл
ІК	6,000±0,572	2,43±0,23
КП	20,9±0,638	9,59±0,44
КП + гель з ресвератролом	16,8±0,72*	8,60 ±0,36*
КП + гель з ресвератролом + таблетки з(Р)	10,4±0,70* <sup>1,2</sup>	5,96 ±0,29 * <sup>1,2</sup>
КП+крем «Колпотрофін»	18,7 ± 0,41*	9,19±0,39

Примітка: \* –  $p < 0,05$  стосовно контрольної групи (КП)  
<sup>1</sup> –  $p < 0,05$  стосовно групи КП + крем «Колпотрофін»  
<sup>2</sup> –  $p < 0,05$  стосовно групи КП + гель з ресвератролом

ними тваринами. Глутатіон є важливим компонентом захисту нейронів, підвищує його стійкість до гіпоксії, обмежує гіперрозвизначність NMDA, виступає як резерв цистеїну в клітині, регулює синтез і стабільність HSP<sub>70</sub>, що бере участь у NO- і IL-1b-залежних механізмах апоптозу (Belenichev et al., 2022).

В експериментах in vitro (таблиця 4), проведених під керівництвом професора І.Ф. Беленічева, було встановлено, що позбавлення рівня GSH у нейронах призводить до зниження рівня HSP<sub>70</sub>, а також в умовах ішемії головного мозку і під впливом токсичних концентрацій стероїдів, нітрозамінів, нейромедіаторів була виявлена кореляція між тяжкістю неврологічних розладів і дефіцитом GSH HSP<sub>70</sub> у мозку тварин (Pavlov & Belenichev, 2014).

Таблиця 3

## Показники неферментативної ланки тіол-дисульфідної системи в головному мозку самок щурів з VCD-гіпоестрогенемією на тлі фармакологічної корекції на 29 добу після лікування (M ± m)

Експериментальні групи	SH-групи, мкм/г білка	SS-групи, мкм/г білка	Глутатіон відн., мкг білка	Глутатіон окислений, мкг білка
ІК	20,9±1,59	2,99 ±0,33	4,57±0,49	0,24±0,032
КП	8,9±0,82	5,58±0,56	1,57±0,18	0,73±0,08
КП + гель з ресвератролом	11,1±1,66*	5,02±0,59	2,01±0,18*	0,59±0,05*
КП + гель з ресвератролом + таблетки з (Р)	18,1±2,9* <sup>1,2</sup>	3,56±0,28 * <sup>1,2</sup>	3,3±0,22* <sup>1,2</sup>	0,37±0,03* <sup>1,2</sup>
КП + крем «Колпотрофін»	9,95±1,13	4,98±0,81	1,72±0,26	0,67±0,08

Примітка: \* –  $p < 0,05$  стосовно контрольної групи (КП)  
<sup>1</sup> –  $p < 0,05$  стосовно групи КП + крем «Колпотрофін»  
<sup>2</sup> –  $p < 0,05$  стосовно групи КП + гель з ресвератролом

Таблиця 4

**Параметри ферментативної ланки тіол-дисульфідної системи в головному мозку самок щурів з VCD-гіпоестрогенемією на тлі фармакологічної корекції на 29 добу після лікування (М ± м)**

Експериментальні групи	ГР, мкм/г білка/хв	ДПР, мкм/г білка/хв
ІК	29,3±3,7	61,4±4,0
КП	8,31±0,64	39,5±3,7
КП + гель з ресвератролом	12,2±2,7*	41,2±4,4
КП + гель з ресвератролом + таблетки з (Р)	22,8±1,9* <sup>1,2</sup>	51,2±6,6 * <sup>1</sup>
КП + крем «Колпотрофін»	9,48±1,4	39,1±3,1

Примітка: \* –  $p < 0,05$  стосовно контрольної групи (КП)  
 1 –  $p < 0,05$  стосовно групи КП + крем «Колпотрофін»  
 2 –  $p < 0,05$  стосовно групи КП + гель з ресвератролом

Також показано, що збільшення концентрації окисленої форми глутатіону призводить до збільшення вироблення прозапальних цитокінів TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 і IL-8, що, своєю чергою, може збільшити дефіцит зниженого глутатіону через порушення його транспортування в клітину і посилити механізми нейродеструкції (Glisic et al., 2018).

Підвищена концентрація окислених проміжних продуктів тіолезульфідної системи пригнічує експресію eNOS (Belenichev et al., 2020) і збільшує вироблення ROS за рахунок виділення арахідонової кислоти з тромбоцитів, пригнічує GPR і GR, а також стимулює багато шляхів внутрішньоклітинної сигналізації, включаючи нейроапоптоз (Dinger et al., 2016). Курсове лікування вагінальним кремом «Колпотрофін» не справило значного впливу на працездатність тіол-дисульфідної системи. Курсове лікування вагінальним гелем з ресвератролом призвело до значного збільшення знижених груп тіолу на 24,7% на тлі збільшення зниженої форми глутатіону на 27,3% і зниження його окисленої форми на 19,1% у цитозолі головного мозку самок применопаузи.

У групах тварин з експериментальною гіпоестрогенемією у разі лікування гелем з ресвератролом спостерігалось значне підвищення активності ГР на 46,8% у цитозолічній фракції головного мозку порівняно з необробленими тваринами. Введення гелю з ресвератролом не вплинуло на активність GPR (Pavlov & Belenichev, 2014). Курс комбінованого застосування гелю з таблетками ресвератролу і ресвератролу призвів до значного збільшення активності GR на 174% і ГП на 29,6% на тлі підвищення рівня зниженого глутатіону на 110,2%

і зниження його окисленої форми на 49,3%, а також збільшення вмісту знижених тіолів на 103,4% і зниження окисленої СС-груп на 36,2% у цитозолі цитозолі мозку самок щурів з VCD-гіпоестрогенемією порівняно з групою нелікованих тварин (Belenichev et al., 2012).

Підвищення функціональності глутатіонної системи, а також підвищення активності ферментів GSH не тільки призводить до підвищення захисту мозку від нейротоксичних продуктів окисного і нітрозивного стресу (зниження нітротирозину в мітохондрії і цитозолі), але і може викликати ГШ-залежні механізми ендogenousного нейрозахисту за рахунок підвищеної експресії HSP<sub>70</sub> (Xue et al., 2014).

Підвищення функціональності тіол-дисульфідної системи у разі VCD-гіпоестрогенемії і підвищення її відновлених інтермедіатів під впливом вагінального і внутрішньошлунково введеного ресвератролу може сприяти підвищенню біодоступності NO за рахунок утворення нітрозотіолів і збільшення експресії мРНК eNOS, а також зниженню перетворення NO в цитотоксичний пероксинітололол. У попередніх роботах ми показали можливий вплив ресвератролу на залежні від HSP<sub>70</sub> механізми ендogenousного нейропротектора (Zauchenko et al., 2021).

Можливо, ресвератрол, модулюючи експресію фактора субтотальної транскрипції NF-каппа-B, здатний збільшити концентрацію HSP<sub>70</sub> і GSH у головному мозку і пригнічувати нейроапоптоз через Fas/Apo-1-тригерний механізм (Roach et al., 2015).

Ресвератрол, завдяки своїм біохімічним властивостям і особливостям своєї хімічної структури, здатний пригнічувати ROS/IL-1 $\beta$ -залежні механізми експресії iNOS, а також накопичення нітротирозину і маркерів окиснювальної модифікації білка, тим самим зменшивши зрушення в тіол-дисульфідній системі головного мозку в бік його проатоптичних окислювальних форм (Li et al., 2018).

## Висновки

**1. Ми вперше встановили, що моделювання гіпоестрогенемії у самок щурів шляхом 15-денного введення VCD призводить до порушення в кон'югованих системах головного мозку – тіол-дисульфідних і нітруксидних.**

**2. Оцінка нейропротекторної та антиоксидантної дії курсу 28-денного введення вагінального гелю «Колпотрофін», вагінального гелю з ресвератролом, а також поєднання таблеток гелю і ресвератролу у самок щурів з гіпоестрогенемією виявило наявність вищевказаних ефектів тільки у разі введення ресвератролу в лікарських формах. Найбільш виражений ефект спостерігався**

за комбінованого застосування таблеток і гелю з ресвератролом.

3. Механізм нейропротекторної та антиоксидантної дії ресвератролу полягає в його здатності нормалізувати нітрооксидну систему – зменшити експресію мРНК iNOS і збільшити експресію eNOS мРНК, пригнічуючи нітрозацизний стрес, а також підвищити активність глутатіонної одиниці тіол-ди-

сульфідної системи (рівень зниженої глутатіону і GR активності) в головному мозку.

4. Отримані результати підтверджують доцільність розробки нового вагінального гелю з комбінованим складом з ресвератролом і гіалуроновою кислотою як альтернативи гормонотерапевтичним препаратам для профілактики і лікування патологічних гіпоестрогенних станів, які піднімаються на тлі дефіциту естрогену.

## ЛІТЕРАТУРА

- Abolaji, A.O., Omozokpia, M.U., Oluwamuyide, O.J., Akintola, T.E., & Farombi, E.O. (2020). Rescue role of Hesperidin in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced toxicity in the brain, ovary, and uterus of Wistar rats. *J. of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 31(2). URL: <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0115>.
- Anishchenko, A.M. (2014). *Fitoestrogeny kak al'ternativa zamestitel'noi gormonal'noi terapii pri gipoestrogenemii* (dissertation). Tomsk. [Anishchenko A.M. (2014) Phytoestrogens as an alternative to hormone replacement therapy for hypoestrogenemia (dissertation), Tomsk. (in Russ.)].
- Belenichev, I.F., Aliyeva, E.G., Kamyshny, O.M., Bukhtiyarova, N.V., Ryzhenko, V.P., & Gorchakova, N.O. (2022). Pharmacological modulation of endogenous neuroprotection after experimental prenatal hypoxia. *Neurochemical J.*, 16(1), 68–75. URL: <https://doi.org/10.1134/s1819712422010044>.
- Belenichev, I.F., Chekman, I.S., Nagornaya, E.A., Gorbacheva, S.V., Gorchakova, N.A., Bukhtiyarova, N.V., Reznichenko, N.Y., & Shakh, F. (2020). *Tiol-disul'fidnaya sistema: rol' v endogennoi tsito- i organoproteksii, puti farmakologicheskoi modulyatsii: monografiya*. Kiev: TOV Vidavnistvo «Yuston». [Belenichev I.F., Chekman I.S., Nagornaya E.A., Gorbacheva S.V., Gorchakova N.A., Bukhtiyarova N.V., Reznichenko N.Yu., Shakh Feroz. (2020) Thiol-disulfide system: role in endogenous cyto- and organoprotection, pharmacological modulation pathways: monograph. Kiev: TOV Vidavnistvo «Yuston» (Ukr.)].
- Belenichev, I.F., Chernii, V.I., Nagornaya, E.A., Pavlov, S.V., Chernii, T.V., Gorchakova, N.A., Bukhtiyarova, N.V., Andronova, I.A., & Kucherenko, L.I. (2014). *Neiroproteksiya i neiroplastichnost': monografiya*. Kyiv: ООО «Poligraf plyus». [Belenichev I.F., Chernii V.I., Nagornaya E.A., Pavlov S.V., Chernii T.V., Gorchakova N.A., Bukhtiyarova N.V., Andronova I.A., Kucherenko L.I. (2014) Neuroprotection and neuroplasticity: monograph. Kyiv: ООО «Poligraf plyus» (Russ.)].
- Belenichev, I.F., Odnokoz, O.V., Pavlov, S.V., Belenicheva, O.I., & Polyakova, E.N. (2012). The neuroprotective activity of tamoxifen and tibolone during glutathione depletion in vitro. *Neurochemical J.*, 6(3), 202–212. URL: <https://doi.org/10.1134/s181971241203004x>.
- Chekman, I.S., Bielenichev, I.F., Nahorna, O.O., Horchakova, N.O., Lukianchuk, V.D., Bukhtiyarova, N.V., & Horbachova, S.V. (2018). *Doklinichne doslidzhennia spetsyifichnoi aktyvnosti pervynnykh i vtorynykh neiroprotektornykh preparativ: Metodichni rekomendatsii*. Kyiv–Zaporizhzhia, 102 p. [Chekman I.S., Bielenichev I.F., Nahorna O.O., Horchakova N.O., Lukianchuk V.D., Bukhtiyarova N.V., & Horbachova S.V. (2018). Preclinical study of specific activity of primary and secondary neuroprotective drugs: Methodical recommendations. Kyiv–Zaporizhzhia. 102 p. (Ukr.)].
- Dinger, J., Möhner, S., & Heinemann, K. (2016). Cardiovascular risks associated with the use of drospirenone-containing combined oral contraceptives. *Contraception*, 93(5), 378–385. URL: <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2016.01.012>.
- Glisic, M., Kastrati, N., Gonzalez-Jaramillo, V., Bramer, W.M., Ahmadizar, F., Chowdhury, R., Danser, A.H., Roks, A.J., Voortman, T., Franco, O.H., & Muka, T. (2018). Associations between phytoestrogens, glucose homeostasis, and risk of diabetes in women: A systematic review and meta-analysis. *Advances in Nutrition*, 9(6), 726–740. URL: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy048>.
- Gurianov, V.G., Liakh, Y.Y., Parii, V.D., Korotkyi, O.V., & Chalyi, O.V. (2018). *Posibnyk z biostatystyky analiz rezul'tativ medychnykh doslidzhen u paketi Ezr (R-Statistics)*. Kyiv: Vistka. [Gurianov V.G., Liakh Yu.Ye., Parii V.D., Korotkyi O.V., Chalyi O.V. [Manual on biostatistics. Analysis of the results of medical research in the package EZR (R-statistics): for masters, interns, clinical residents, and graduate students in the field of knowledge “Health”]. Kyiv: Vistka, 2018:206. ISBN 978-617-7157-67-9. (Ukr.)].
- Ilovayskaya, I.A. (2018). Menopausal hormone treatments and risk of cardiovascular diseases: Modern view. *Gynecology*, 20(4), 40–43. URL: [https://doi.org/10.26442/2079-5696\\_2018.4.40-43](https://doi.org/10.26442/2079-5696_2018.4.40-43).
- Li, Y., Huang, J., Yan, Y., Liang, J., Liang, Q., Lu, Y., Zhao, L., & Li, H. (2018). Preventative effects of resveratrol and estradiol on streptozotocin-induced diabetes in ovariectomized mice and the related mechanisms. *PLOS ONE*, 13(10). URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204499>.
- Pavlov, S.V., & Belenichev, I.F. (2014). Molecular and biochemical aspects of the neuroprotective effect of the selective estrogen receptor modulator tamoxifen in a model of acute cerebral ischemia. *Neurochemical Journal*, 8(1), 28–32. URL: <https://doi.org/10.1134/s1819712413040077>.
- Plaksina, N.D., & Simonovskaya, K.Y. (2014). Vozmozhnosti negormonal'noi korrektsii vazomotornykh paroksizmov v postmenopauze. *StatusPraesens. Ginekologiya. Akusherstvo. Besplodnyi Brak.*, 2(19), 60–65. [Plaksina N.D., Simonovskaya Kh.Yu. (2014) Possibilities of non-hormonal correction of vasomotor paroxysms in postmenopause. StatusPraesens. Ginekologiya. Akusherstvo. Besplodnyi brak., 19, 60–65 (Russ.)].
- Radzinskiy, V.E., & Khamoshina, M.B. (2016). Nereshennyye problemy sovremennoi ginekologii. *Doktor Ru.*, 7(124), 4–9. [Radzinskiy V.E., Khamoshina M.B. Unsolved Problems in Modern Gynecology: Quo vadis? Doktor Ru, 7(124), 4–9. (Russ.)].



Rietjens, I.M., Louisse, J., & Beekmann, K. (2016). The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1263–1280. URL: <https://doi.org/10.1111/bph.13622>.

Roach, R.E.J., Helmerhorst, F.M., Lijfering, W.M., Stijnen, T., Algra, A., & Dekkers, O.M. (2015). Combined oral contraceptives: The risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. URL: <https://doi.org/10.1002/14651858.cd011054.pub2>.

Shestakova, I.G., Bettikher, O.A., & Aleev, I.A. (2015). Nadezhde na oasis-byt'! Urogenital'naya atrofiya kak sledstvie defitsita estrogenov: izlechima i predotvratima. *StatusPraesens. Ginekologiya, Akusherstvo, Besplodnyi Brak*, 5(28), 52–59. [Shestakova I.G., Bettikher O.A., & Aleev I.A. (2015) Hope for an oasis to be! Urogenital atrophy as a consequence of estrogen deficiency: curable and preventable. *StatusPraesens. Ginekologiya, Akusherstvo, Besplodnyi Brak.*, 5(28), 52–59 (Russ)].

Smetnik, V.P. (2014). Starenie reproduktivnoi sistemy zhenshchiny: kliniko-gormonal'noe obosnovanie stadii, terminologiya. *Doktor Ru*, 12(100), 13–16. [Smetnik V.P. (2014) Female Reproductive Aging: Describing Terminology and Identifying Different Stages Based on Clinical and Hormonal Characteristics. *Doktor Ru*. 12(100), 13–16 (Russ)].

Xue, Y.-Q., Di, J.-M., Luo, Y., Cheng, K.-J., Wei, X., & Shi, Z. (2014). Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–9. URL: <https://doi.org/10.1155/2014/765832>.

Zaichenko, A.V., Gorchakova, N.A., Striga, E.A., & Ruban, O.I. (2017). Farmakolohichne obhruntuvannia rozrobky novykh likarskykh preparativ na osnovi resveratrolu. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*, 4(1), 21–30. [Zaichenko, A.V., Gorchakova, N.A., Striga, E.A., Ruban, O.I. (2017) Pharmacological ground of the new drugs' elaboration on the resveratrol base. *Bulletin of problems biology and medicine*, 4(1), 21–30 (Ukr)].

Zaychenko, G.V., Karpenko, N.O., Striga, E.A., & Sinitsyna, O.S. (2018). Pharmacological management of Menopausal Disorders: The phytoestrogens (review). *Problems of Endocrine Pathology*, 66(4), 65–74. URL: <https://doi.org/10.21856/j-pep.2018.4.07>.

Zaychenko, G.V., Stryga, O.A., Belenichev, I.F., & Sorokopud, K.Y. (2021). Influence of different resveratrol dosage forms on indicators of endogenous neuroprotection in experimental hypoestrogenic state. *Biological Markers and Guided Therapy*, 8(1), 1–11. URL: <https://doi.org/10.12988/bmgt.2021.91022>.

Özel, F., Kiray, M., Göker, A., Aydemir, S., & Mıcılı, S.C. (2020). Protective effect of alpha-lipoic acid on 4-vinylcyclohexene diepoxide induced primary ovarian failure in female rats. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 59(2), 293–300. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.01.020>.

Надійшла до редакції 27.12.2021.

Прийнято до друку 12.01.2022.

Конфлікт інтересів відсутній.