

## ПОРУШЕННЯ ФУНКЦІОНУВАННЯ СПОЛУЧЕНОЇ СИСТЕМИ “ВІДНОВЛЕНІ ТІОЛИ – ОКСИД АЗОТУ” ПРИ ГОСТРОМУ ПОРУШЕННІ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ ТА МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ЇХ КОРЕКЦІЇ

*Експериментальне гостре порушення мозкового кровообігу моделювали шляхом двосторонньої оклюзії загальних сонних артерій у щурів. Стан антиоксидантної системи в мозковій тканині оцінювали за активністю ключових ферментів тіол-дисульфідної системи та показниками нітрозативного стресу. Моделювання гострого ішемічного ураження головного мозку супроводжувалося порушенням тіол-дисульфідної рівноваги, підвищенням активності NO-синтази і рівня нітротирозину, що свідчить про розвиток оксидативного та нітрозативного стресу. Використання модуляторів тіол-дисульфідної системи – тіотриазоліну й ангіоліну дозволяє встановити найбільш оптимальне співвідношення між рівнями відновленої та окисненої тіольних груп і глутатіону. Це вказує на активну участь тіол-дисульфідної системи в нейтралізації продуктів вільнорадикального окиснення. Виявлені ефекти препаратів можна пояснити наявністю в їх структурі тіольної групи, яка відіграє роль скавенджеру NO та сприяє обмеженню цитотоксичної дії нітрозативного стресу.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** порушення мозкового кровообігу, тіол-дисульфідна рівновага, тіотриазолін, ангіолін, оксид азоту, система глутатіону.

ВСТУП. Протягом багатьох років судинні захворювання головного мозку займають лідируючі позиції серед причин захворюваності, смертності та інвалідизації у всьому світі. Порушення мозкового кровообігу ішемічного характеру становлять близько 80 % [1]. Весь комплекс лікувальних заходів, що стосуються ішемічного інсульту, можна умовно розділити на два блоки: базисну терапію (терапевтичну реперфузію), спрямовану на підтримку всіх життєво важливих функцій організму, і патогенетичну терапію, спрямовану на відновлення порушеного кровотоку, переривання швидких механізмів глутаматної ексайтотоксичності та пригнічення явищ відстроченого локального запалення [2]. У блоці патогенетичної терапії виділяють первинну і вторинну нейропротекцію. Важливим напрямком вторинної нейропротекції є антиоксидантна терапія. Як свідчать дослідження останніх років, за умов ішемії головного мозку активні форми кисню за допомогою активації *redox*-чутливих каскадів синтезу факторів ядерної транскрипції білка посилюють експресію прозапальних

© С. В. Горбачова, І. Ф. Бєленічев, Л. І. Кучеренко, 2015.

цитокінів, беруть участь у формуванні локального запального вогнища в головному мозку, підсилюючи явища набряку, ініціюють явища апоптозу і некрозу [3]. Таким чином, доцільно включити в комплексну терапію мозкових інсультів препарати, що переривають каскад вільнорадикальних реакцій. З цією метою використовують антиоксидантні препарати, що є пастками різних активних форм кисню, – мексидол, емоксипін, тіотриазолін [1].

Отримано обнадійливі результати при призначенні тіольних антиоксидантів – скавенджерів оксиду азоту (NO) (тіотриазоліну,  $\alpha$ -ліпоєвої кислоти, ацетилцистеїну) за умов мозкового інсульту. Тіольні антиоксиданти здатні підвищувати біодоступність NO, пов'язуючи його цитотоксичні деривати, і нормалізувати показники поєднаної з NO тіол-дисульфідної системи. Дані характеристики дозволяють вважати тіольні антиоксиданти перспективними засобами вторинної нейропротекції [3–5].

До перспективних напрямків створення високоефективних нейропротекторів належить модифікація молекули найбільш активної

структури. На даний час, виходячи з аналізу літературно-патентних даних і результатів власних досліджень, такою структурою є тіотриазолін [6]. Новий оригінальний препарат "Ангіолін", створений на НВО "Фарматрон", містить структурні фрагменти 1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату і залишок L-лізину.

Метою даної роботи було вивчити антиоксидантну активність препарату "Ангіолін" у гострий період експериментального порушення мозкового кровообігу (ГПМК) порівняно з пірацетамом і тіотриазоліном.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження проводили на 50 білих щурах лінії Вістар масою 180–220 г, яких утримували в стандартних умовах віварію і поділили на п'ять експериментальних груп: 1-ша – псевдооперовані (n=10); 2-га – тварини з експериментальним ГПМК (контроль, n=10); 3-тя – ГПМК+пірацетам у дозі 500 мг/кг (n=10); 4-та – ГПМК+тіотриазолін у дозі 100 мг/кг (n=10); 5-та – ГПМК+ангіолін у дозі 50 мг/кг (n=10). Усі експериментальні процедури та оперативні втручання проводили відповідно до Положення про використання лабораторних тварин в біомедичних дослідженнях. Гостре порушення мозкового кровообігу викликали шляхом незворотної двосторонньої оклюзії загальних сонних артерій. Процедуру виконували під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг), за допомогою хірургічного доступу виділяли загальні сонні артерії, підводили під них шовкові лігатури і перев'язували. Препарати вводили внутрішньочеревно в зазначених дозах 1 раз на добу. Псевдооперованим і тваринам контрольної групи протягом дослідження внутрішньочеревно вводили фізіологічний розчин. З експерименту щурів виводили під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) [8].

Для імуноферментних та біохімічних досліджень використано фрагменти, що містяться в ділянці сенсомоторної зони кори головного мозку, які були гомогенізовані у рідкому азоті. Цитозольну фракцію виділяли методом диференційного центрифугування (15 000 g) при температурі +4 °C на 0,15 M фосфатному буфері з рН 7,8. Вміст нітротирозину визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу з використанням стандартного тест-набору "Nitro-tirosine ELISA Kit" ("HyCult biotechnology") згідно з доданою до набору інструкцією. Рівень гомоцистеїну в гомогенаті тканин мозку визначали ензиматичним методом за допомогою стандартного тест-набору виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" згідно з доданою до набору інструкцією. Рівень SS- і SH-груп визначали спектрофотометрично з подальшим обчисленням

тіол-дисульфідного коефіцієнта –  $TDK=SH/SS$  [9]. Рівень окисненого і відновленого глутатіону визначали флюориметрично [10]. Активність глутатіонпероксидази (ГПО) і глутатіонредуктази (ГР) оцінювали спектрофотометрично [11]. Активність цистатіонін- $\beta$ -синтази визначали спектрофотометрично [10]. Концентрацію метіоніну та цистеїну в гомогенаті визначали хроматографічно [6].

Дані представлено у вигляді середнього арифметичного і стандартної помилки середнього значення ( $M \pm m$ ). Результати дослідження оброблено з використанням статистичного пакета ліцензійної програми STATISTICA® for Windows 6.0 (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а також Microsoft Excel 2010. Статистичну обробку проводили із застосуванням t-критерію Стьюдента і U-критерію Манна-Уїтні. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності з рівнем значущості менше 0,05 (95 %).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати проведених нами досліджень вказують на те, що формування ГПМК у щурів призводить до зміщення тіол-дисульфідної системи у вигляді зменшення пулу її відновлених форм (табл. 1). Так, за даних умов відзначали виражене (на 95 %), порівняно з групою псевдооперованих тварин, зниження значень ТДК, а також збільшення в 2,3 раза рівня окисненого глутатіону. При функціонуванні глутатіонозалежної ферментативної системи в тканинах мозку щурів із ГПМК зареєстровано порівнянне зниження активності ГПО та ГР на 77 % ( $p < 0,001$ ) і 73,3 % ( $p < 0,001$ ) відповідно (табл. 1).

При цьому характерним було достовірне підвищення рівня гомоцистеїну в 4,6 раза ( $p < 0,001$ ) на тлі вираженого пригнічення цистатіонін- $\beta$ -синтази на 62,8 % ( $p < 0,001$ ) (табл. 2). Паралельно відзначено істотне підвищення рівня нітротирозину в гомогенаті мозку щурів із ГПМК – в 4,12 раза ( $p < 0,001$ ). Дані зміни вказують на розвиток оксидативного і нітрозативного стресу.

За умов проведення експериментальної терапії було отримано такі результати впливу використаних препаратів на тіол-дисульфідну рівновагу (табл. 1). Після курсового введення пірацетаму в гомогенаті мозку відзначали достовірне зменшення вмісту нітротирозину і цистеїну, тоді як зміни значень інших досліджуваних показників мали лише характер тенденції. Слід відмітити, що при використанні тіотриазоліну та ангіоліну спостерігали більш виражені зміни. Вони характеризувалися значним зростанням ТДК порівняно з контролем, а також

Таблиця 1 – Показники тіол-дисульфідної рівноваги в головному мозку тварин із ГПМК

Група тварин	SH-групи, ммоль/г білка	SS-групи, ммоль/г білка	Глутатіон віднов., мкмоль/г тканини	Глутатіон окисн., мкмоль/г тканини	ГР, ум. од./ (хв·г тканини)	ГПО, ум. од./ (хв·г тканини)
Псевдооперовані	19,7±1,5	3,2±0,3	4,1±0,8	0,35±0,06	19,1±1,2	62,4±2,5
ГПМК (контроль)	4,8±0,62	17,2±1,64	0,62±0,1	0,76±0,1	5,2±0,72	14,2±1,54
ГПМК+пірацетам	5,2±0,27	13,5±0,78	0,64±0,12	0,55±0,05	6,2±0,61	17,5±1,95
ГПМК+тіотриазолін	10,3±0,65**	5,1±0,43**	3,1±0,2**	0,40±0,06*	14,8±0,74**	42,6±2,24**
ГПМК+ангіолін	12,8±0,46*#1	4,4±0,61**	3,6±0,75**	0,40±0,07*	15,5±0,9**	51,7±2,19**

Примітки. Тут і в наступній таблиці:

- \* –  $p < 0,05$  відносно групи тварин із ГПМК.
- # –  $p < 0,05$  відносно групи тварин із ГПМК та введенням пірацетаму.
- 1 –  $p < 0,05$  відносно групи тварин із ГПМК та введенням тіотриазоліну.

підвищенням рівня відновленого глутатіону на тлі зниження вмісту його окисненої форми. Дані явища при використанні тіотриазоліну супроводжувалися і активацією ферментативної ланки антиоксидантної системи у вигляді підвищення активності ГР та ГПО в 2,8 і 3 рази відповідно. Подібними за спрямованістю і більш вираженими були зміни аналогічних показників у групі тварин, яким вводили ангіолін. Так, відзначали значне, порівняно з контролем, зростання значень ТДК, а також підвищення активності ГР та ГПО в 2,9 ( $p < 0,005$ ) і 3,7 рази ( $p < 0,001$ ) відповідно. У свою чергу, рівень окисненого глутатіону в цій групі знижувався на 47,4 % ( $p < 0,05$ ), а вміст його відновленої форми збільшувався в 5,8 рази.

Введення пірацетаму викликало зниження вмісту в тканинах мозку потенційних нейротоксичних речовин – нітротирозину (на 39,1 %) і гомоцистеїну (на 14,3 %), але при цьому вплив на функціональність цистатіонін- $\beta$ -синтази не мав достовірного характеру (табл. 2). Водночас тіотриазолін сприяв зменшенню кількості нітротирозину і гомоцистеїну на 56,6 % ( $p < 0,05$ ) та 43,6 % ( $p < 0,05$ ) відповідно, при цьому підвищуючи активність цистатіонін- $\beta$ -синтази на 117,7 % ( $p < 0,05$ ). Ангіолін за даних умов чинив більш виражену дію порівняно з групою тварин, які отримували пірацетам і тіотриазолін, а за показниками активності ГПО, рівнями гомоцистеїну і цистеїну перевершував значення останнього ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, отримані дані вказують на те, що формування ГПМК у щурів супроводжується активацією процесів вільнорадикального окиснення і подальшого розвитку окисної напруги, що відіграє ключову патогенетичну роль у процесах ушкодження головного мозку. Оксидативний стрес, у свою чергу, потенціює запальні процеси, спотворює характер NO-залежної регуляції, модифікує білки і ліпіди, впливаючи на їх функціональну активність. Відомо, що саме зміни з боку тіольної ланки антиоксидантної системи, які проявляються зниженням відновленої та підвищенням окисненої форм, є однією з ранніх ознак порушення захисту клітин при ГПМК [12]. Зменшення рівня відновленого глутатіону в тканинах мозку, виявлене в щурів із ГПМК, можливо, є наслідком порушення його синтезу, пов'язаного з порушенням тканинного дихання. Це, у свою чергу, призводить до зниження рівня АТФ, необхідного для синтезу глутатіону. Іншою причиною зменшення пулу внутрішньоклітинного глутатіону може бути дефіцит рівня цистеїну внаслідок його активного використання як антиоксиданта, що також показано в наших дослідженнях (табл. 2). Збільшення функціонування системи глутатіону, а також пов'язаних з його обміном антиоксидантних ферментів захищає мозок від активних форм  $O_2$ , продуктів пероксидації і, певною мірою, дозволяє відновити рівновагу та поліпшити редокс-регуляцію [4].

Таблиця 2 – Активність цистатіонін- $\beta$ -синтази та вміст нейротоксичних сполук у головному мозку тварин із ГПМК

Група тварин	Нітротирозин, ммоль/г білка	Цистатіонін- $\beta$ -синтаза, ум. од./ (хв·г білка)	Гомоцистеїн, ммоль/г тканини	Цистеїн, ммоль/г тканини	Метіонін, ммоль/г тканини
Псевдооперовані	5,7±0,62	25,8±2,45	5,6±0,52	31,5±1,63	28,6±1,49
ГПМК (контроль)	23,5±1,85	9,6±1,31	25,9±2,1	11,4±0,74	12,5±0,82
ГПМК+пірацетам	14,3±1,28*	12,1±2,2	22,2±0,96	14,5±0,63*	15,3±0,86
ГПМК+тіотриазолін	10,2±0,9**	20,9±2,9**	14,6±0,8**	22,8±1,3**	24,7±1,2**
ГПМК+ангіолін	7,3±1,3*#1	22,6±2,1**	11,4±0,7**1	25,2±1,5**1	24,4±1,6**

**ВИСНОВКИ.** Проведення експериментальної церебропротективної терапії у щурів із ГПМК сприяє зниженню інтенсивності оксидативного стресу в нервовій тканині. Однак ступінь вираження змін, залежно від використаного лікарського засобу, в кожній групі різний. Найбільш істотні зміни отримано при застосуванні ангіоліну. Значна антиоксидантна активність даного препарату зумовлена наявністю в його структурі тіольної групи, завдяки якій він має яскраво виражені відновні властивості та здатність приймати від різних активних форм кисню електрони. При цьому сірка в тіольних групах переходить від дво- до чотиривалентної.

З вищевикладеного випливає, що ангіолін, як і тіотриазолін, можна віднести до групи антиоксидантів, що є “пастками” вільних радикалів. Ця група препаратів переводить вільні радикали кисню в неактивний стан, сприяє реактивації антиоксидантних ферментів [9].

Таким чином, отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для клінічного застосування тіольних скаведжерів NO в комплексній нейропротективній терапії з метою фармакокорекції порушень у сполученій системі “відновлені тіоли – NO” й обмеження цитотоксичної дії нітрозативного стресу.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Румянцева С. А. Патологическая основа комплексной нейропротекции при ишемии мозга / С. А. Румянцева, В. В. Афанасьев, Е. В. Силина // Журн. неврологии и психиатрии. – 2009. – № 3. – С. 64–68.
2. Гусев Е. И. Церебральный инсульт: проблемы и решения / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, М. Ю. Мартынов // Вестник РАМН. – 2003. – № 11. – С. 44–48.
3. Острая церебральная недостаточность / В. И. Черный, В. Н. Ельский, Г. А. Городник, А. Н. Колесников. – Донецк : ООО “ИПП “Промінь”, 2007. – 514 с.
4. Тиол-дисульфидное равновесие – определяющий фактор резистентности нейронов к нитрозирующему стрессу в условиях ишемии / Ю. М. Колесник, И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, С. В. Горбачева // Журнал НАМН України. – 2013. – **19**, № 1. – С. 3–11.
5. Колесниченко Л. С. Изучение системы глутатиона у больных с хронической церебральной ишемией / Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский, В. В. Шпрах // Паллиативная медицина и реабилитация : науч.-практ. журн. – 2004. – № 2. – С. 40–41.
6. Беленичев І. Ф. Продукти вільнорадикального окиснення та методи їх ідентифікації (огляд літератури) / І. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицький, Ю. І. Губський // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – № 4. – С. 9–14.
7. Павлюк І. В. Молекулярные аспекты нейропротективного действия нового препарата “Ангиолин” при формировании хронической алкогольной интоксикации у крыс // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. – 2013. – № 2 (Д). – С. 30.
8. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / О. В. Стефанов. – К. : Авіцена, 2002. – 527 с.
9. Верлан Н. В. Клинико-фармакологический анализ состояния системы глутатиона при церебральной ишемии : дис. ... д-ра мед. наук / Верлан Н. В. – М., 2008. – 210 с.
10. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа / В. С. Асатиани. – М. : Наука, 1969. – 739 с.
11. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М. И. Прохорова. – Л. : Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 272 с.
12. Горожанская Э. Г. Содержание глутатиона и активность глутатион-S-трансферазы как фактор прогноза эффективности лекарственной терапии / Э. Г. Горожанская, В. Б. Ларионова, Г. Н. Зубрихина // Рос. онкол. журн. – 2002. – № 5. – С. 29–32.

## НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СОПРЯЖЕННОЙ СИСТЕМЫ "ВОССТАНОВЛЕННЫЕ ТИОЛЫ – ОКСИД АЗОТА" ПРИ ОСТРОМ НАРУШЕНИИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ

### Резюме

Экспериментальное острое нарушение мозгового кровообращения моделировали путем двусторонней окклюзии общих сонных артерий у крыс. Состояние антиоксидантной системы в мозговой ткани оценивали по активности ключевых ферментов тиол-дисульфидной системы и показателям нитрозативного стресса. Моделирование острого ишемического поражения головного мозга сопровождалось нарушением тиол-дисульфидного равновесия, повышением активности NO-синтазы и уровня нитротирозина, что свидетельствует о развитии оксидативного и нитрозативного стресса. Использование модуляторов тиол-дисульфидной системы – тиотриазолина и ангиолина позволяет установить наиболее оптимальное соотношение между уровнями восстановленной и окисленной тиольных групп и глутатиона. Это указывает на активное участие тиол-дисульфидной системы в нейтрализации продуктов свободнорадикального окисления. Выявленные эффекты препаратов объясняются наличием в их структуре тиольной группы, которая играет роль сквенджера NO и способствует ограничению цитотоксического действия нитрозативного стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нарушение мозгового кровообращения, тиол-дисульфидное равновесие, тиотриазолин, ангиолин, оксид азота, система глутатиона.

S. V. Horbachova, I. F. Bielenichev, L. I. Kucherenko  
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, SPO "FARMATRON"

## MALFUNCTIONS OF THE CONJUGATED SYSTEM "RESTORING THIOLS – NITROGEN OXIDE" WITH ACUTE CEREBROVASCULAR ACCIDENT AND POSSIBLE CORRECTION

### Summary

Experimental acute ischemic stroke was modeled by bilateral occlusion of the common carotid arteries in rats. Antioxidant system in the brain tissue was evaluated by the activity of key enzymes of thiol and disulfide indicators nitrosative stress. Simulation of acute ischemic accompanied by violation of the thiol-disulfide balance and increased nitrotyrosine levels, indicating that the development of oxidative and nitrosative stress in brain tissue. It is established that the use of thiol-containing antioxidants – Thiotriazoline and Angiolin set the highest possible ratio between the levels of reduced and oxidized thiol groups and glutathione, which indicates that the active mobilization of thiol-disulfide system in the neutralization products of free-radical oxidation. Identified effects of the drugs used due to the presence in their structure of the thiol group, which contributes to the normalization of the glutathione system in conditions of oxidative stress.

KEY WORDS: cerebrovascular accident, thiol-disulfide balance, thiotriazolin, angiolin, nitric oxide, glutathione system.

Отримано 30.09.15

Адреса для листування: С. В. Горбачова, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.